

**OPTIMALISASI PRODUKSI DAN AKTIVITAS FITASE
TERHADAP VARIASI MEDIA (SUMBER FITAT
DAN SUMBER NITROGEN) OLEH BAKTERI
Burkholderia lata Strain HF ENDOFIT
TANAMAN JAGUNG (*Zea mays*)**



Skripsi

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

ALAUDDIN
M A K A S S A R

Oleh:

MUHAMMAD MASLAN

60300113013

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UIN ALAUDDIN MAKASSAR**

2017

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Maslan
NIM : 60300113013
Tempat / Tgl. Lahir : Barru / 16 Juni 1995
Jur/Prodi : Biologi/S1
Fakultas : Sains dan Teknologi
Alamat : JL. Yusuf Bauty BTN Graha Annisa Permai Blok A1 No.3
Judul : Optimalisasi Produksi Dan Aktivitas Fitase Terhadap Variasi Media (Sumber Fitat Dan Sumber Nitrogen) Oleh Bakteri *Burkholderia Lata* Strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)”.

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah hasil karya sendiri. Jika di kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Makassar, 28 Agustus 2017

Penyusun



Muhammad Maslan

NIM: 60300113013

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “**Optimalisasi Produksi Dan Aktivitas Fitase Terhadap Variasi Media (Sumber Fitat Dan Sumber Nitrogen) oleh Bakteri *Burkholderia Lata* Strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)**”, yang disusun oleh Muhammad Maslan, NIM: 60300113013, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang *munaqasyah* yang diselenggarakan pada hari Jumat, 25 Agustus 2017, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi.

Makassar, 28 Agustus 2017 M

06 Dzulhijah 1438 H

DEWAN PENGUJI :

Ketua	: Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag.	(.....)
Sekretaris	: Hasyimuddin, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy I	: Isna Rasdianah, Aziz S.Si., M.Sc.	(.....)
Munaqisy II	: Eka Sukmawaty, S.Si., M.Si.	(.....)
Munaqisy III	: Dr. Aan Farhani, M.Ag.	(.....)
Pembimbing I	: Hafsan, S.Si., M.Pd.	(.....)
Pembimbing II	: Dr. Mashuri Masri. S.Si., M.Kes.	(.....)

Diketahui oleh:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar,



Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag.

NIP. 19710412 200003 1 001

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Pembimbing penulisan skripsi saudara **Muhammad Maslan**, NIM: 60300113013, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, setelah meneliti dan mengoreksi dengan seksama skripsi yang berjudul **“Optimalisasi Produksi Dan Aktivitas Fitase Terhadap Variasi Media (Sumber Fitat Dan Sumber Nitrogen) Oleh Bakteri *Burkholderia Lata* Strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)”**, memandang bahwa skripsi tersebut telah memenuhi syarat-syarat ilmiah dan dapat disetujui untuk diajukan ke sidang munaqasyah.

Demikian persetujuan ini diberikan untuk diproses lebih lanjut.

Makassar, 28 Agustus 2017

Pembimbing I

Pembimbing II

Hafsan S.Si., M.Pd

NIP. 19810912 200912 2 008

Dr.Mashuri Masri S.Si., M.Kes.

NIP. 19801216 2009912 1 008

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI

ALAUDDIN

MAKASSAR

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah swt. yang Mahapengasih lagi Mahapenyayang atas limpahan rahmat, nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Optimalisasi Produksi Dan Aktivitas Fitase Terhadap Variasi Media (Sumber Fitat dan Sumber Nitrogen) Oleh Bakteri *Burkholderia Lata Strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)***”. Salawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Baginda Besar Nabiullah Muhammad saw. beserta keluarga dan para sahabatnya hingga pada umatnya, Nabi diutus sebagai khalifa kepermukaan bumi ini dan untuk menuntun manusia dari lembah kebiadaban menjadi kebaikan seperti sekarang ini yang menjadi suri taula dan uswatun hasanah bagi kita semua.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar. Penyusunan skripsi tidak terlepas dari hambatan dan tantangan, namun berkat kerja keras, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak-pihak langsung maupun tidak langsung yang memperlancar jalannya penyusunan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik. Terimah kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua tercinta Ayahanda MANNA dan Ibunda HALIJAH atas doa dan dukungannya. Kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih secara mendalam, tulus dan ikhlas serta penghargaan yang setinggi-tingginya disampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Musafir Pababbari, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar serta seajarannya.
2. Prof. Dr. H. Arifuddin, M.Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar dan seajarannya.
3. Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes., selaku Ketua Jurusan Biologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.

4. Baiq Farhatul Wahidah, S.Si., M.Si., selaku Sekretaris Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
5. Hafsan, S.Si., M.Pd sebagai Dosen Pembimbing I dan Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes sebagai Dosen Pembimbing II yang sabar memberikan bimbingan, arahan, masukan, dan telah meluangkan waktu membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Isna Rasdianah S.Si., M.Sc., Eka Sukmawaty S.Si., M.Si., dan Dr. Aan Farhani M.Ag. selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan masukan yang sangat bermanfaat bagi penelitian dan penulisan skripsi.
7. Seluruh Bapak/Ibu Dosen Pengaja yang selama ini telah mengajarkan banyak hal serta pengetahuan yang berlimpah selama kuliah di kampus ini serta seluruh Staf Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar.
8. Kepala Laboratorium dan seluruh Laboran Laboratorium Jurusan Biologi FST UIN Alauddin Makassar yang memberikan ilmu, arahan, dan membantu selama penelitian ini.
9. Kepala perpustakaan beserta jajarannya, terima kasih bantuannya selama ini.
10. Keluarga dan Saudaraku Maslina, Sudirman, Mahir, dan Mansur terimah kasih memberikan semangat, doa dan dorongan demi kesuksesan penulis dalam menempuh S1.
11. Spesial untuk “PHYTASE TEAM” suka dan duka hidup sebagai mahasiswa kita rasakan bersama terima kasih atas do’a dan dukungannya atas kerja sama dalam penelitian ini.
12. Sahabat-sahabat dan teman-teman seperjuangan “BRACHIALIS” angkatan 2013 jurusan biologi yang telah memberikan dukungan dan motivasi serta banyak kenangan yang tak terlupakan selama ini.
13. Adik-adik angkatan 2014, 2015, dan 2016 jurusan biologi, terimakasih atas dukungan dan doanya selama ini.
14. Teman-teman KKN-53 UIN Alauddin Makassar kec. Bontonompo, terimah kasih atas bantuan dan kenangannya.

15. Serta terimakasih kepada seluruh pihak terkait yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas doa, semangat, dukungan, saran dan pemikiran yang diberikan kepada penulis.

Dalam penulisan skripsi ini, penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak kekurangan-kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan, maka hanya kepada Allah swt. jualah menyerahkan segalanya, untuk itu penulis mengharapakan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak, demi perbaikan skripsi ini. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya, semoga kita semua mendapat curahan & Rihdo dari-Nya, Aamin yaarabbal alamin...

Makassar, 28 Agustus 2017
Penulis

Muhammad Maslan
NIM: 60300113013



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERSETUJUAN PEMBIMBING	iv
KATA PENGANTAR	v-vii
DAFTAR ISI	vii-ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	 1-12
A. Latar Belakang	1-6
B. Rumusan Masalah	6-7
C. Ruang Lingkup Penelitian.....	7
D. Kajian Pustaka	7-11
E. Tujuan Penelitian	11-12
F. Kegunaan Penelitian	12
 BAB II TINJAUAN TEORITIS	 13-41
A. Ayat yang Relevan	13-16
B. Tinjauan Enzim	16-20
C. Tinjauan Umum Faktor yang Mempengaruhi Enzim	20-24
D. Tinjauan Umum Asam Fitat	24-28
E. Tinjauan Umum Enzim Fitase	29-32
F. Tinjauan Umum Bakteri Produksi Fitase.....	32-36
G. Tinjauan Umum Bakteri Endofit <i>Burkholderia lata</i> strain HF	36-40
H. Kerangka Pikir	41
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN	 42-52
A. Jenis dan Pendekatan Penelitian	42
B. Variabel Penelitian	42
C. Rancangan Penelitian	42-43
D. Definisi Operasional Variabel.....	43-44

E. Metode Pengumpulan data.....	44
F. Alat dan Bahan.....	44-45
G. Prosedur Kerja	45-51
H. Teknik Pengolahan dan Analisis Data	51-52
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	53-74
A. Hasil Penelitian	53-55
B. Pembahasan	56-74
C. Implikasi Hasil Penelitian	74-75
BAB V PENUTUP	76
A. Kesimpulan	76
B. Saran	76
KEPUSTAKAAN	77-86
LAMPIRAN-LAMPIRAN	87-113
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	114



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Asam Fitat yang terdapat dalam berbagai baha.....	27
Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Fitat dan Nitrogen.....	43
Tabel L.3a,b,c Kompoisi media LB dan PPM (<i>Phytase Production Medium</i>)...	89
Tabel L.10 Data Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Burkholderia lata</i> Strain HF	100
Tabel. L.11a Pengukuran kurva standar protein (BSA) metode Bradford	101
Tabel L. 11b Absorbansi pengukuran protein Fitase.....	102
Tabel L. 11c Data pengukuran kadar protein enzim fitase (mg/mL)	102
Tabel L. 12a Pengukuran Kurva Standar Fosfat KH_2PO_4	103
Tabel L. 12b Absorbansi pengukuran aktivitas Fitase	104
Tabel L 12c Data pengukuran aktivitas Fitase	104



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim.....	21
Gambar 2.2. Pengaruh pH pada Aktivitas Enzim	22
Gambar 2.3. Pengaruh Konsentrasi Enzim pada Laju Aktivitas	23
Gambar 2. 4. Pengaruh Konsentrasi Substrat pada Aktivitas Enzim.....	24
Gambar 2.5. Struktur Kompleks Fitat-Mineral	24
Gambar 2.6. Hidrolisis Asam Fitat Oleh Fitase	30
Gambar 2.7. Zona Bakteri Enfoit Tanaman Jagung (<i>Zea mays</i>)	37
Gambar 4.2. Kurva Pertumbuhan <i>Burkholderia lata</i>	54
Gambar 4.3. Aktivitas Fitase dan Kadar Protein <i>Burkholderia lata</i> terhadap variasi media (Sumber Fitat dan Sumber Nitroge	55
Gambar L.11a Kurva Standar Protein BSA Metode Bradford	101
Gambar L.12a Kurva Standar Fosfat (KH_2PO_4)	103
Gambar L.13 Dokumentasi Alur Penelitian	105-109
Gambar L.14 Dokumentasi Alat dan Bahan	110-113

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema Penelitian	87
Lampiran 2 Skema Alir Penelitian	88
Lampiran 3 Komposisi dan Cara Pembuatan Media	89
Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7	90
Lampiran 5 Perhitungan Pembuatan Substrat Aktivitas Fitase 100 mL Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 mengandung 2 mM Ca-Fitat dan 2 mM CaCl ₂	91
Lampiran 6 Skema Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Burkholderia lata</i> Strain-HF.....	92
Lampiran 7 Skema Produksi Enzim Fitase	93
Lampiran 8 Skema Pengukuran Kadar Protein metode Bradford	94-96
Lampiran 9 Skema Uji Aktivitas Fitase	97-99
Lampiran 10 Data Kurva Pertumbuhan <i>Burkholderia Lata</i> strain HF	100
Lampiran 11 Data Penentuan Kadar Protein Fitase	93-102
Lampiran 12 Data Penentuan Aktivitas.....	103-104
Lampiran 13 Dokumentasi Penelitian	105- 106
Lampiran 14 Dokumentasi Alat dan Bahan	110-113

ABSTRAK

Nama : Muhammad Maslan
NIM : 60300113013
Judul Skripsi : “Optimalisasi Produksi an Aktivitas Fitase terhadap Variasi Media (Sumber Fitat dan Sumber Nitrogen) oleh Bakteri *Burkholderia lata* Strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)”

Allah swt. menurunkan al-Quran sebagai pedoman hidup umat manusia. (QS.al-Sajadah/32: 27) Tanaman biji-bijian, sereal, atau kacang-kacangan dijadikan sebagai pakan ternak yang mengandung asam fitat tidak dapat dicerna saluran pencernaan hewan monogastrik karena asam fitat ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) merupakan zat antinutrisi yang mampu mengikat sekitar 80% P dalam pakan, juga mengikat protein, vitamin dan mineral (Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++}) maka untuk mengatasi masalah tersebut dibutuhkan produksi enzim fitase oleh bakteri (QS. al-Baqarah/2: 26) karena enzim fitase dapat menghidrolisi asam fitat **Tujuan:** untuk mengetahui fase pertumbuhan bakteri *Burkholderia lata* strain HF dan optimalisasi produksi aktivitas fitase dari variasi media PPM (sumber fitat dan nitrogen). **Metode:** Jenis penelitian ini adalah kuantitatif dengan pendekatan deskriptif. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor, masing-masing variasi sumber fitat: kalsium (Ca) fitat, bekatul padi, bekatul jagung, dan kedelai. Sumber nitrogen: $(NH_4)_2SO_4$, yeast extract, dan pepton. **Hasil:** fase pertumbuhan *Burkholderia lata* sebagai patokan untuk produksi fitase yaitu fase stasioner 62 jam dengan nilai OD 2,060 log/sel. Produksi fitase optimum pada variasi media PPM yaitu kedelai-pepton dengan nilai kadar protein 46,5 mg/mL dan nilai aktivitas 8.20 U/mL pada kondisi pH 7 dengan inkubasi 37°C selama 62 jam. Jadi, aktivitas fitase produksi PPM tanaman sereal memiliki nilai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan media PPM Ca-fitat yang nilai aktivitasnya rendah.

Kata Kunci: Asam Fitat, *Burkholderia lata* strain HF, dan Ekstrak Kasar Fitase.

ABSTRACT

Name : Muhammad Maslan
NIM : 60300113013
Skripsi Title : “The Optimization Production and Phytase Activity to Variation of Medium (Source of phytate and Nitrogen) by Bacteria *Burkholderia lata* Strain HF Endophytic Corn Plant (*Zea mays*)”

Allah SWT. Lowering the al-Qur'an as a guide for human life. (QS.al-Sajadah/32: 27) Grain, cereal, or bean crops used as animal feed containing phytic acid can not be digested by monogastric animal digestive tracts because phytic acid ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) is an antinutrient substance capable of binding around 80% P in feed, also binds proteins, vitamins and minerals (Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++}) then to solve the problem is required production of bacterial enzyme (QS al-Baqarah/2: 26) because phytase enzyme can hydrolyzing phytic acid Objective: to determine the bacterial growth phase of *Burkholderia lata* strain HF and optimization of phytase activity production from PPM media variation (source of phytate and nitrogen). Method: This research type is quantitative with descriptive approach. The research design used a complete randomized design (RAL) with a factorial pattern consisting of 2 factors, each of which varied sources of phytate: calcium (Ca) phytate, rice bran, corn bran and soybean. Nitrogen sources: $(NH_4)_2SO_4$, yeast extract, and peptone. Result: *Burkholderia lata* growth phase as benchmark for phytase production is stationary phase 62 hours with value of OD 2,060 log/cell. The optimum phytase production on PPM media variations were soybean-peptone with protein content value of 46,5 mg/mL and activity value 8.20 U/mL at pH 7 condition with incubation 37°C for 62 hours. So, the effectiveness of the PPM production of cereal plants has a higher activitability value than the low-activity PPM Ca-phytate media.

Keywords: Phytic Acid, *Burkholderia lata* strain HF, and Crude Fitase Extract.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Allah menurunkan al-Quran kepada Nabi Muhammad saw. dan untuk umat manusia sebagai pedoman hidup di dunia dan akhirat. Adanya berbagai jenis makhluk hidup yang diciptakan Allah di alam semesta ini merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah bagi orang yang mau berpikir. Segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah memiliki faedah yang sangat berguna bagi kesejahteraan manusia. Allah swt. berfirman dalam QS. al-Sajadah/32: 27.

أَوَلَمْ يَرَوْا أَنَّا نَسُوقُ الْمَاءَ إِلَى الْأَرْضِ الْجُرُزِ فَنُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا تَأْكُلُ مِنْهُ أَنْعَامُهُمْ
وَأَنْفُسُهُمْ أَفَلَا يُبْصِرُونَ ﴿٢٧﴾

Terjemahnya:

Dan tidakkah mereka memperhatikan, bahwa Kami mengarahkan (awan yang mengandung) air ke bumi yang tandus, lalu Kami tumbuhkan (dengan air hujan itu) tanam-tanaman sehingga hewan-hewan ternak mereka dan mereka sendiri dapat makan darinya. Maka mengapa mereka tidak memperhatikan? (Kementrian Agama RI, 2013: 417).

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2003), Allah swt. berfirman “*Dan tidakkah mereka memperhatikan, bahwa Kami mengarahkan (awan yang mengandung) air ke bumi yang tandus*”. Ayat tersebut bahwa Allah swt. menjelaskan kasih sayang-Nya kepada makhluk-Nya, serta kebaikan-Nya kepada mereka dengan dikirimkannya air, baik yang berasal dari langit atau dari sumber-sumber mata air yang dibawa oleh sungai atau yang mengalir dari pegunungan ke tanah yang membutuhkannya yaitu

bumi yang tandus. Yang dimaksud bumi yang tandus yaitu tanah yang tidak memiliki tumbuh-tumbuhan. Namun dengan di turunkan air hujan itu, tumbuhlah tanaman-tanaman yang bermanfaat untuk makanan hewan ternak dan untuk manusia sendiri. Maka mengapa manusia tidak memperhartikan. Manusia sebagai makhluk yang diberi kelebihan akal oleh Allah untuk meneliti dan memperhatikan apa yang telah diciptakan-Nya.

Allah swt. tidak akan menciptakan segala sesuatu dengan sia-sia, seperti keanekaragaman dan sumber daya alam yang ada di bumi, terutama di Negara Indonesia. Indonesia merupakan Negara yang memiliki keanekaragaman hayati seperti tumbuhan yang di dalamnya terdapat senyawa organik biomolekul yang tidak terbatas jumlahnya. Berbagai jenis tumbuhan banyak dijumpai berbagai wilayah Indonesia, salah satunya Sulawesi. Kondisi yang mendukung kesuburan tanah yang menyebabkan tumbuhan dapat dilestarikan diberbagai bidang seperti bidang kesehatan dan di bidang industri (Yulianti dkk, 2010). Semuanya jenis tumbuhan memiliki faedah untuk kehidupan makhluk dan untuk kesejahteraan manusia. Jenis tumbuhan yang dimanfaatkan untuk kebutuhan hidup baik dijadikan bahan pangan seperti tanaman serelia atau biji-bijian selain itu juga dijadikan untuk kebutuhan hewan ternak, sehingga industri ternak dapat mengembangkan dan memenuhi kebutuhan masyarakat akan pakan hewan yang semakin meningkat produksinya. Namun pada pakan ternak seperti jagung, kedelai, dedak padi dan sereal atau kacang-kacangan, terdapat senyawa asam fitat yang bersifat zat antinutrisi. Hal ini berdasarkan dalam firman Allah QS.Yasin/36: 33.

وَأَيُّهُمْ أَلَّا رَضُ الْمَيِّتَةُ أَحْيَيْنَهَا وَأَخْرَجْنَا مِنْهَا حَبًّا فَمِنْهُ يَأْكُلُونَ ﴿٢٠﴾

Terjemahnya:

Dan suatu tanda (Kebesaran Allah) bagi mereka adalah bumi yang mati (tandus). Kami hidupan bumi itu dan Kami keluarkan darinya biji-bijian, maka dari (biji-bijian) itu mereka makan (Kementrian Agama RI, 2013: 442).

Menurut Shihab (2002) penggunaan bentuk jamak pada kata *ahyaina* dan *akhrajna* mengisyaratkan adanya keterlibatan selain Allah dalam hal menghidupkan bumi dan menumbuhkan tumbuh-tumbuhan. Keterlibatan tangan manusia adalah salah satunya, manusialah yang menanam biji kemudian Allah menumbuhkan. Maka dari itu keluarlah buah dan biji yang bermanfaat dan berguna untuk kebutuhan hidup makhluk.

Sereal, biji-bijian atau kacang-kacang merupakan sumber pangan bagi kehidupan (sumber karbohidat, protein nabati) dan dijadikan sumber nutrisi untuk hewan dalam bentuk pakan. Namun sereal, biji-bijian atau kacang-kacang juga mengandung asam fitat. Asam fitat merupakan bentuk utama penyimpanan fosfor lebih 80% di dalamnya terkandung (Reddy, 1982). Sedangkan menurut Sreedevi and Reddy (2013) asam fitat dalam kondisi alami atau pH netral, akan membentuk ikatan baik dan akan berasosiasi dengan mineral bervalensi dua (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , P^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , dan K^{2+}), maupun protein menjadi senyawa kompleks yang sukar larut, sehingga dapat menghambat penyerapan mineral di dalam tubuh dan kekurangan mineral dapat menyebabkan gangguan metabolisme dengan menimbulkan dampak negatif pada hewan monogastrik.

Pada ternak ruminansia mencerna asam fitat dengan bantuan fitase diproduksi dalam tubuhnya sendiri oleh mikro flora ruminal anaerobik. Sedangkan hewan monogastrik seperti unggas dan ikan kekurangan fitase dalam saluran pencernaannya sehingga asam fitat tidak dapat dihidrolisis dalam saluran pencernaan hewan monogastrik (satu lambung) (Pallauf, 1997). Menurut Mittal et al (2011). Asam fitat juga merupakan bentuk penyimpanan utama dalam masalah pencernaan hewan monogastrik sehingga menimbulkan masalah dalam ketersediaan fosfor pencernaannya, maka fosfor ikut keluar bersama tinja dan urin, hal itu juga menyebabkan pencemaran lingkungan sehingga kandungan fosfor lingkungan tanah meningkat.

Untuk mengatasi masalah pencernaan hewan monogastrik dan pencemaran lingkungan. Maka dibutuhkan penambahan enzim fitase atau senyawa fosfat anorganik pakan ternak. Menurut Hayati (2008) dalam Nurjannah (2013) Enzim merupakan molekul protein bersifat katalisator yang dihasilkan oleh sel hidup dan digunakan oleh sel-sel tersebut untuk mengkatalisis reaksi biokimia secara spesifik. Dalam melakukan aktifitas enzim akan bekerja secara maksimum apabila kondisi proses berlangsung secara optimum antara lain konsentrasi substrat, derajat keasaman (pH), dan suhu.

Fitase termasuk kelompok enzim phosphomonoesterases yakni mio-inositol eksakisfosfat 3-fosfohidrolase (EC 3.1.3.8) dan mio-inositol eksakisfosfat 6-fosfohidrolase, (EC 3.1.3.26) dan mampu memulai pelepasan bertahap fosfat dari asam fitat atau mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate (Blaabjerg et al., 2011).

Mio-inositol-heksakisfosfat 3-fosfohidrolase (EC.3.1.3.8) pertama kali di temukan oleh Suzuki *et al.* dalam penelitiannya tentang hidrolisis bekatul. Fitase adalah enzim yang dapat memecah atau menghidrolisis senyawa fitat pada ikatan fosfoester menjadi mio-inositol dan fosfat organik (asam fosfat). Fitase terdapat di dalam biji-bijian dan menyerang gugus fosfat pada posisi nomor 6 dari asam fitat. Fitase dari mikroba menyerang gugus fosfat pada posisi ke-3 (Zyla, 1992 dalam Susana, 2000).

Fitase banyak digunakan dalam industri pangan dan pakan ternak. Adanya fitase pada bahan pangan manusia akan memudahkan dalam pencernaan asam fitat, sedangkan fitase pada bahan pakan ternak akan meningkatkan kualitas nutrisi pakan ternak dan mengurangi polusi fosfat (Vieille dan Zeikus, 2001 dalam Sari, 2013). Fitase telah dimanfaatkan sebagai probiotik pada hewan ternak monogastrik, sebagai campuran pakan ternak unggas (Sajidan, 2004) dan sebagai sumber fosfat organik pada pakan ayam broiler (Yunu, 2004 dalam Santoso, 2013).

Fitase dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, jamur, yeast), tumbuhan dan jaringan tubuh ternak. Maka bakteri sebagai salah satu penghasil enzim yang potensial menjadi faktor penting dalam produksi enzim (Santoso, 2013). Selain itu mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling banyak digunakan dibandingkan tanaman dan hewan. Enzim yang diisolasi dari mikroorganisme memiliki beberapa keunggulan yaitu dinilai lebih menguntungkan karena pertumbuhannya cepat dan mudah di perbanyak, dapat ditumbuhkan pada substrat yang murah, potensi produksinya tidak terbatas, potensi fitase mikroba dalam memproduksi enzim dapat ditingkatkan, dan dapat dikendalikan. Menurut Waluy (2009) dalam

Wulandari (2015) bahwa produksi enzim dari suatu mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh faktor internal, yaitu faktor genetik pada DNA dari masing-masing mikroorganisme. Sedangkan faktor eksternal komposisi media produksi, agitasi, suhu, pH media, dan sumber karbon. Maka penelitian ini memproduksi fitase dengan menggunakan bakteri *Burkholderia lata*.

Beberapa penelitian yang mengunjuk mikroorganisme untuk produksi enzim fitase seperti *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp. *Citrobacter braakii*, *Escherichia coli*, *Raoultella* sp, *Enterobacter Klebsiella* sp. *Lactobacillus sanfranciscensis* dan bakteri anaerobik rumen *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella* sp., *Mitsuokella multiacidus* dan *Mitsuokella jalaludinii* (Chunshan et al. 2001 dalam Rejibeula, 2012), *Schwanniomyces castellii* (Segueilha et al. (1992) dalam Pandey, 2001), *Aspergillus niger* (P. Suvarnalatha Deviet al, 2015), dan *Penicillium purpurogenum* (Awad et al, 2014), Sebagai upaya produksi fitase yang dapat diaplikasikan dalam berbagai kepentingan terutama kualitas pakan, maka perlu dilakukan penelitian mengenai optimalisasi optimalisasi produksi dan aktivitas fitase terhadap variasi media (sumber fitat dan sumber nitrogen) oleh bakteri *Burkholderia lata strain HFendofit* tanaman jagung (*Zea mays*).

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana fase pertumbuhan bakteri *Burkholderia lata* untuk produksi fitase?

2. Bagaimana optimalisasi produksi aktivitas fitase dari variasi media (sumber fitat dan sumber nitrogen) pada bakteri *Burkholderia lata*?

C. Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian menggunakan satu bakteri endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*) penghasil fitase yaitu *Burkholderia lata* koleksi dari laboratorium mikrobiologi FST UINAM. Bakteri yang digunakan hanya untuk memproduksi enzim kasar fitase terhadap optimalisasi variasi media (sumber fitat dan sumber nitrogen). Waktu dan tempat akan di lakukan pada bulan 13 Maret – 14 April 2017 bertempat di laboratorium mikrobiologi jurusan biologi fakultas sains dan teknologi (FST) universitas islam negeri (UIN) alauddin makassar kampus II Samata.

D. Kajian Pustaka

Dalam kajian pustaka dibahas beberapa temuan hasil penelitian sebelumnya untuk melihat kejelasan arah, originalitas, kemanfaatan, dan posisi dari penelitian ini, dibandingkan dengan beberapa temuan penelitian yang dilakukan sebelumnya yaitu sebagai berikut:

1. Menurut Hosseinkhani (2009) dengan judul penelitian analisis produksi fitase bakteri (*Pseudomonas* sp). dari kotoran unggas dan optimasi produksi enzim. Bahwa hasil menunjukkan produksi fitase *Pseudomonas* dengan aktivitas zona bening 23 mm pada media padat dan aktivitas fitase 800 U/ml dalam PSM cair. Enzim ekstrak diproduksi dalam tahap akhir dari pertumbuhan eksponensial. Maksimum produksi Fitase dengan ini terisolasi diperoleh setelah inkubasi 72

jam, suhu 28 °C dan 180 rpm digatasi. Sumber karbon dan nitrogen yang terbaik untuk maksimum produksi fitase adalah 1,5% glukosa dan 0,5% ekstrak malt.

2. Menurut T. Selvamohan et al (2012) dengan judul penelitian optimasil produksi fitase oleh *Pseudomonas* sp. isolat dari kotoran unggas. Bahwa hasil penelitian menunjukkan Fitase produksi di *Pseudomonas* sp yang diisolasi dari kotoran unggas yang telah diteliti dan dioptimalkan. Dalam penelitian hadir. Pengaruh sumber substrat produksi fitase dari tanaman pangan pertanian ole *Pseudomomas* sp. mengungkapkan bahwa jumlah maksimum Fitase diproduksi dengan bekatul ragi sebagai substrat daripada substrat lainnya digunakan dalam penelitian. Semua jenis substrat yang digunakan dalam penelitian untuk produksi Fitase diamati di 72 jam fermentasi dan pH 5 dan 37°C sebagai suhu maksimum dan pH optimal. Amonium sulfat dan Sukrosa diamati sebagai sumber nitrogen dan karbon yang terbaik untuk lebih tinggi tingkat Fitase produksi. Demikian pula Trikalsium fosfat diidentifikasi sebagai sumber fosfat baik untuk maksimum produksi fitase oleh bakteri *Pseudomonas* sp.
3. B. Sasirekha et al. (2012), dalam penilitiannya Optimasi dan pemurnian parsial fitase ekstraseluler dari *Pseudomonas aeruginosa* p6. Lima puluh isolat mampu menghasilkan fitase diisolasi dari berbagai sampel tanah. Dari lima puluh isolat lima isolat menunjukkan aktivitas fitase maksimal. P6 isolat dipilih untuk lanjut studi P6 isolat biokimia ditandai sebagai *Pseudomonas* spp. Kondisi kultur dioptimalkan untuk produksi enzim maksimum. sumber karbon dan nitrogen terbaik untuk produksi fitase maksimum adalah 1% glukosa dan yeast extract

0,5% masing-masing. Enzim stabil antara pH 4 sampai 10 tetapi pH optimal ditemukan 6. Enzim juga stabil antara suhu berkisar 30°C hingga 50°C, tetapi suhu terbaik untuk aktivitas enzim ditemukan 37°C. Aktivitas fitase maksimum adalah 98,76 U/ml setelah 24 jam inkubasi dalam kondisi optimal. Aktivitas spesifik enzim mentah 31.86 Umg-1 protein dan ini meningkat menjadi 70.77 Umg-1 protein oleh presipitasi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4. El-Toukhy et al (2013), dalam penelitiannya isolasi, permurnian dan karakterisasi fitase dari *Bacillus subtilis* MJA. Tiga strain bakteri yang diisolasi dari tanah. Di antara tiga strain terisolasi, satu diidentifikasi morfologi dan dikonfirmasi oleh teknik molekuler seperti *Bacillus subtilis* MJA dengan aktivitas fitase yang tinggi. Bakteri fitase yang memproduksi diisolasi menggunakan media fitat skrining agar (PSM) dengan glukosa hanya 1,5% dan 0,5% natrium fitat sebagai satu-satunya sumber untuk karbon. Dalam rangka mengoptimalkan produksi fitase oleh *B. subtilis* MJA, faktor yang berbeda dipelajari. Kombinasi glukosa 0,5% dan 0,5% sukrosa menunjukkan menjadi sumber karbon terbaik. Juga, ekstrak malt digunakan sebagai sumber nitrogen memberi produksi fitasetertinggi. Juga, produksi fitase maksimum terdeteksi setelah inkubasi selama empat hari (720 U/ml) pada nilai pH optimal 7.
5. Muthuraman et al, (2013) dalam penelitiannya isolasi produksi fitase bakteri dari kotoran unggas dan optimasi dari kultur tingkat produksi fitase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diantara ketiga isolat, *Pseudomonas fluorescens* memiliki aktivitas sangat tinggi dalam mendegradasi fitat. Dedak gandum, ekstrak ragi dan

kalium dihidrogen fosfat pada pH 6 yang masing-masing diidentifikasi sebagai sumber karbon, nitrogen dan fosfat terbaik. Enzim stabil dengan CaCl_2 pada suhu $40\text{-}50^\circ\text{C}$ dan pH 6-7. Ditingkatkan produksi dilakukan dalam bioreaktor 3 L dan aktivitas enzim ditemukan 32,94 U / ml.

6. Nurhikma (2017) dalam penelitian Isolasi dan skrining bakteri endofit penghasil fitase dari tanaman jagung (*Zea mays*). Hasil menunjukkan terdapat 10 isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim fitase dari tanaman jagung (*Zea mays*). Empat isolat yang memiliki Indeks Fitatik (IF) tertinggi dari masing-masing organ yaitu AKAR 10^{-7} KL.7 dengan Indeks Fitatik (IF) 1,365 cm, BATANG 10^{-7} KL.2 dengan Indeks Fitatik (IF) 1,095 cm, DAUN 10^{-6} KL.3 dengan Indeks Fitatik (IF) 1,36 cm dan BIJI 10^{-8} KL.1 dengan Indeks Fitatik (IF) 0,98 cm., kemudian dilanjutkan untuk karakterisasi biokimia. Ciri mikroskopik sel dari keempat isolat yang terpilih yakni dua isolat berbentuk *coccus* yaitu isolat AKAR 10^{-7} KL.7 dan DAUN 10^{-6} KL.3, dua isolat berbentuk *basil* yaitu isolate BATANG 10^{-7} KL.2 dan BIJI 10^{-8} KL.1. Hasil pewarnaan gram yakni keempat isolat yang terpilih adalah bakteri gram negatif (-). Karakteristik keempat isolat yakni pada uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) hasil uji isolate AKAR 10^{-7} KL.7 adalah negatif (-), isolate BATANG 10^{-7} KL.2, DAUN 10^{-6} KL.3 dan BIJI 10^{-8} KL.1 adalah positif (+). Uji H_2S hasil uji keempat isolat adalah negatif (-). Uji Motilitas hasil uji isolat AKAR 10^{-7} KL.7 adalah negatif (-), isolat BATANG 10^{-7} KL.2, DAUN 10^{-6} KL.3 dan BIJI 10^{-8} KL.1 adalah positif (+). Uji Katalase hasil uji keempat isolat adalah positif (+). Uji *Indol* hasil uji keempat isolat adalah negatif (-). Uji *Methyl Red* hasil uji

isolat AKAR 10^{-7} KL.7, DAUN 10^{-6} KL.3, BIJI 10^{-8} KL.1 adalah negatif (-), isolat BATANG 10^{-7} KL.2 adalah positif (+). Uji *Voges Paskeur* hasil uji isolat AKAR 10^{-7} KL.7 adalah negatif (-), isolat BATANG 10^{-7} KL.2, DAUN 10^{-6} KL.3 dan BIJI 10^{-8} KL.1 adalah positif (+). Uji *Citrath* hasil uji keempat isolat adalah positif (+). Uji fermentasi karbohidrat pada isolat AKAR 10^{-7} KL.7 laktosa negatif (-), maltose dan glukosa positif (+), pada isolate BATANG 10^{-7} KL.2, DAUN 10^{-6} KL.3 dan BIJI 10^{-8} KL.1 laktosa, maltose dan glukosa positif (+).

7. Harvianti (2017) dalam penelitian identifikasi molekuler bakteri endofit penghasil fitase asal tanaman jagung (*Zea mays* L.) berbasis gen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan Empat isolat bakteri yang memiliki indeks fitatik tertinggi masing-masing mewakili setiap organ tanaman jagung (*Zea mays* L.) yaitu isolat dari Akar 10^{-7} KL-7 (IF= 1,365), isolat biji 10^{-8} KL-1 (IF=0,98), isolat daun 10^{-6} KL-3 (IF=1,36) dan isolat batang 10^{-7} KL-2 (IF=1,095). Setelah diidentifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa isolat dari Akar 10^{-7} KL-7 memiliki kesamaan 98% dengan *Burkholderia lata*, isolat biji 10^{-8} KL-1 memiliki kesamaan 99% dengan *Enterobacter cloacae subsp dissolven*, isolat daun 10^{-6} KL-3 memiliki kesamaan 98% dengan *Enterobacter ludwigii* dan isolat batang 10^{-7} KL-2 memiliki kesamaan 97% dengan *Pantoea stewartii subsp indologenes*.

E. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui fase pertumbuhan bakteri *Burkholderia lata* untuk produksi fitase.

2. Untuk mengetahui optimalisasi produksi aktivitas fitase dari variasi media (sumber fitat dan sumber nitrogen) pada bakteri *Burkholderia lata*.

F. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dalam melakukan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dapat membuktikan secara ilmiah dan memberikan informasi kepada masyarakat penggunaan enzim fitase dapat dimanfaatkan pada pakan ternak untuk membantu pencernaan ternak dalam proses penyerapan nutrisi.
2. Menambah pengetahuan dibidang peternakan, bahwa penambahan enzim fitase pada pakan ternak dapat meningkatkan kualitas nutrisi pakan broiler.
3. Dapat memberikan pengembangan ilmu pengetahuan tentang enzim fitase pada jurusan biologi dan civitas akademik UIN Alauddin Makassar.
4. Dapat dijadikan sebagai bahan perbandingan dari penelitian selanjutnya.
5. Dapat dipublikasikan mengenai enzim fitase.

BAB II

TINJAUAN TEORITIS

A. Ayat yang Relevan

Allah swt. menciptakan segala sesuatu yang tidak sia-sia dan juga sebagai perumpamaan dengan petunjuk kehidupan, agar manusia berpikir, mencari atau meneliti manfaat dan kerugiannya. Dan kemudian Allah telah menciptakan semuanya dan manusia diberi akal untuk memikirkan ciptaan-nya mengenai tanda-tanda kekuasaan Allah swt seperti penciptaan mikroorganisme merupakan salah satu makhluk ciptaan Allah yang dihendaki sesuai dengan firman Allah QS. al-Baqarah/2: 26.

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ﴾

Terjemahnya:

Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata: "Apakah maksud Allah dengan perumpamaan ini?" dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang dibiarkan-Nya sesat, dan dengan itu banyak (pula) orang yang diberi-Nya petunjuk. Tetapi tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu selain orang-orang yang fasik (Kementrian Agama RI, 2013: 5).

Menurut Ibnu Katsir (2003) bahwa Ketika Allah swt. menyebutkan laba-laba dan lalat, orang yang musyrik pun bertanya, “untuk apa laba-laba dan lalat itu disebut?” lalu Allah swt. Menurunkan ayat yang terjemahnya, *Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu.* Makna ayat tersebut adalah Allah swt. memberitahukan bahwa dia tidak memandang remeh. Ada yang mengartikan, tidak takut untuk membuat perumpamaan apa saja baik dalam bentuk yang kecil maupun besar.

Jadi perumpamaan yang lebih kecil dari nyamuk juga salah satunya yaitu mikroorganisme (bakteri), karena segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah swt. tidak sia-sia, seperti halnya bakteri endofit tanaman jagung *Burkholderia lata* penghasil fitase yang merupakan salah satu mikroorganisme yang paling kecil dan sangat besar manfaatnya terutama dalam produksi enzim fitase yang dapat diaplikasikan untuk meningkatkan kualitas pakan ternak dan membantu pencernaan hewan monogastrik dalam menghidrolisis asam fitat pada pakan. Jenis pakan yang digunakan dalam pemberian makanan ternak yaitu tanaman sereal atau biji-bijian, dan ini berdasarkan dalam firman Allah QS. Abasa’/80: 24-32.

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ۚ ﴿٢٤﴾ أَنَّا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ﴿٢٥﴾ ثُمَّ شَقَقْنَا
الْأَرْضَ شَقًّا ﴿٢٦﴾ فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعَيْنًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا
﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَيْكِهَةً وَآبًا ﴿٣١﴾ مَّتَعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَمِكُمْ ﴿٣٢﴾

Terjemahnya:

Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya Kami telah mencurahkan air melimpah (dari langit), Kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya, Lalu di sana Kami tumbuhkan biji-bijian, dan anggur dan sayur-sayuran, dan Zaitun dan pohon kurma, dan kebun-kebun (yang) rindang, dan buah-buahan serta rerumputan, (semua itu) untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu (Kementrian Agama RI, 2013: 584-585).

Menurut Ibnu Katsir (2003), bahwa dalam firmanNya “*maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya,*” hal ini ayat tersebut terkandung upaya meningkatkan pemberian karunia. Selain itu, terkandung juga dalil penumbuh tumbuh-tumbuhan dari bumi yang mati untuk menunjukkan penghidupan kembali jasad-jasad setelah. sebelumnya berupa tulang belulang yang berserakan dan tanah bertebaran. Kemudian dilanjutkan dalam firman-Nya “*Sesungguhnya Kami telah mencurahkan air melimpah (dari langit).*” Maksudnya dari ayat tersebut kami telah menurunkan air dari langit ke bumi. Disambung dengan ayat “*Kemudian kami belah bumi dengan sebaik-baiknya.*” Yakni kami tempatkan air itu di sana, lalu ia masuk ke dalam lapisan tanah, selanjutnya masuk ke dalam biji-bijian yang terdapat di dalam bumi, sehingga tumbuh, tinggi, dan tampak permukaan bumi. “*Lalu di sana Kami tumbuhkan biji-bijian.*” Yang dimaksud *al-babb* yaitu semua biji-bijian. Selain itu juga ditumbuhkan anggur dan sayur-sayuran, dan zaitun dan kurma.

Pada ayat *wahadaaiqa gulban* yakni kebun-kebun sebagai tempat pepohonan. Allah berfirman yang terjemahnya: “*dan buah-buahan serta rumput-rumputan,*” kata *al-faakihah* adalah hasil yang dikelurkan dari tumbuhan berupa buah-buahan. Ibnu ‘Abbas berkata: *al-faakihah* adalah sesuatu yang dimakan dalam keadaan berair (basah) dan *al-abb* adalah sesuatu yang tumbuh dari tanah yang di

komsumsi oleh binatang ternak dan tidak dimakan oleh manusia. Dan firman Allah swt. juga “*untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu,*” yakni semua dijadikan sebagai bekal hidup dan untuk binatang ternak kalian di dunia ini sampai hari kiamat.

Penelitian ini berdasarkan dari ayat tersebut, bahwa biji-bijian, kacang-kacangan, atau sereal dari hasil pertanian dijadikan sebagai makanan pokok dan sampai sekarang ini juga dijadikan pakan hewan ternak dalam membantu pengembangan industri ternak. Biji-bijian banyak terkandung asam fitat yang sukar dicerna pada hewan monogastrik seperti ternak ayam, karena asam fitat ini bersifat senyawa kompleks yang mengikat posfor, mineral, vitamin dan protein-proteirlainya, maka diperlukan enzim fitase dalam membantu pencernaanya.

B. Tinjauan Umum Enzim

Organisme hidup mampu mendapatkan dan menggunakan energi dengan cepat karena adanya katalis enzim. Sebagaimana katalis anorganik, enzim mengubah kecepatan suatu reaksi, tetapi tidak mempengaruhi kesetimbangan akhir reaksinya. Enzim dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk perubahan besar pada molekul substrat (Bintang, 2010).

Enzim dihasilkan dari tanaman, hewan, dan mikroba, tetapi enzim dari mikroba memberikan hasil yang lebih besar melalui teknik fermentasi dan lebih mudah memperbaiki produktivitasnya dibandingkan enzim dari tanaman dan hewan.

Enzim yang dihasilkan dari mikroba dapat dikontrol dengan memberikan bahan pemacu dalam medium (Hidayat dkk, 2006).

Pada tahun 1850, Louis Pasteur menyimpulkan bahwa fermentasi gula menjadi alkohol oleh ragi yang dikatalisis “fermen”. Pasteur mengemukakan bahwa fermentasi ini yang kemudian dinamakan enzim (di dalam ragi) tidak bisa dipisahkan dari struktur sel ragi hidup, suatu pendapat yang bertahan selama bertahun-tahun. Penemuan penting oleh Eduard Buchner tahun 1897 berhasil mengekstrak ke dalam larutan, suatu bentuk yang aktif dari sel ragi, yaitu serangkaian enzim yang mengkatalisis fermentasi gula jadi alkohol. Penemuan ini membuktikan, bahwa enzim yang penting ini, yang mengkatalisis lintas metabolik untuk penghasil energi, dapat tetap berfungsi jika dipindahkan dari struktur sel hidup. Baru pada tahun 1926, enzim urease dapat disolasi dan dikristalkan oleh James Sumner, beliau juga menemukan bahwa semua enzim adalah protein yang memiliki berat molekul antara 12.000-1 juta (Humang, 2013).

Enzim adalah protein yang mengkatalisis semua reaksi biokimia, yang merupakan zat yang dapat mempercepat laju reaksi kimia tanpa ikut bereaksi di dalamnya (katalisator). Karena enzim terdapat dalam organisme hidup maka enzim disebut biokatalisator. Enzim bekerja spesifik (hanya dapat mengikat 1 jenis substrat) dan diperlukan dalam jumlah sedikit. Enzim membutuhkan suatu komponen untuk berfungsi sebagai katalis, komponen tersebut adalah kofaktor (Humang, 2013).

Enzim dapat berupa protein murni atau gabungan antara protein dengan gugusan-gugusan kimiawi lainnya. Seperti halnya semua protein, enzim akan

terdenaturasi oleh panas, terpresipitasi (terendapkan) oleh etanol atau garam-garam anorganik berkonsentrasi tinggi seperti aluminium sulfat, dan tidak dapat melewati membran semipermeabel atau membrane selektif dengan kata lain tak terdialisis. Protein enzim adalah molekul yang sangat besar, berat molekulnya berkisar antara lebih kurang 10.000 sampai seratus juta. Banyaknya enzim terdiri dari protein yang bergabung dengan molekul organik dengan berat molekul rendah yang dinamakan *koenzim*. Bagian protein disebut apoenzim. Bila bergabung, kedua bagian tersebut membentuk enzim lengkap disebut *holoenzim* (Pelczar, 2006).

Enzim merupakan katalis untuk proses biokimia yang terjadi di dalam maupun diluar sel. Suatu enzim bekerja secara khas terhadap suatu substrat tertentu dan kekhasan inilah yang menjadi ciri suatu enzim. Untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat harus ada kontak antara enzim dengan substrat. Suatu enzim memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan substrat. Oleh karena semua bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Bagian enzim yang melakukan kontak dengan substrat disebut sisi aktif. Dan kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat (Poadjiadi, 1994).

Molekul selalu bergerak dan bertumbukan satu sama lain. Jika suatu molekul substrat menumbuk molekul enzim yang tepat, maka akan menempel pada enzim kemudian terjadi reaksi dan terbentuk molekul produk. Ada 2 teori mengenai kerja enzim, yaitu (Siregar, 2010):

a. Teori gembok anak kunci (*key-lock*)

Sisi aktif enzim mempunyai bentuk tertentu yang hanya sesuai untuk satu jenis substrat saja. Substrat sesuai dengan sisi aktif seperti gembok kunci dengan anak kuncinya. Hal itu menyebabkan enzim bekerja secara spesifik. Jika enzim mengalami denaturasi (rusak) karena panas, bentuk sisi aktif berubah sehingga substrat tidak sesuai lagi. Perubahan pH juga mempunyai pengaruh yang sama.

b. Teori cocok terinduksi (*induced fit*)

Sisi aktif enzim lebih fleksibel dalam menyesuaikan struktur substrat. Ikatan antara enzim dan substrat dapat berubah menyesuaikan dengan substrat.

Komisi Internasional Union of Biochemistry (IUB) menciptakan yang spesifik (Taringan, 1998), bahwa enzim-enzim yang termasuk satu golongan, nama tersebut menjadi bagian akhir dari nama enzim. Ada 6 golongan enzim tersebut sebagai berikut:

- 1) Oksidoreduktase, enzim-enzim ini melaksanakan katalisis reaksi oksidasi-reduksi yaitu reaksi yang melibatkan oksidasi suatu senyawa disertai reduksi senyawa lain.
- 2) Tranferase, enzim-enzim ini melaksanakan katalisis reaksi yang mengalihkan suatu gugus yang mengandung C, N, P dan S dari suatu senyawa ke senyawa yang lain tanpa melibatkan oksidasi reduksi.
- 3) Hidrolase, enzim ini melaksanakan katalis reaksi pemecahan hidrolitik atau sebaliknya. Kelompok ini tidak meliputi enzim yang melaksanakan kalaisis reaski penambahan atau pelepasan air dari suatu senyawa.

- 4) Liase, enzim ini melaksanakan katalis C-C, C-O, C-N dan sebagainya tanpa melibatkan hidrolisis atau oksidasi-reduksi.
- 5) Isomerase, enzim ini melaksanakan katalis reaksi isomerisasi yang merupakan penataan kembali atom-atom yang membentuk suatu molekul.
- 6) Ligase, enzim ini melaksanakan katalis reaksi pembentukan ikatan antara dua molekul substrat yang terkait dengan pemutusan ikatan pirofosfat dalam ATP atau senyawa energi tinggi lainnya.

C. Tinjauan Umum Faktor yang Mempengaruhi Enzim

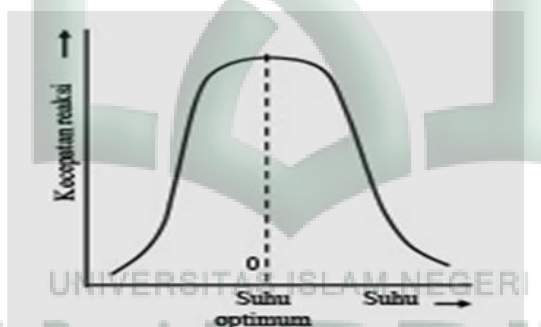
Aktivitas enzim merupakan kemampuan suatu enzim yang mengkatalisi reaksi enzimatik pada substrat yang sesuai (Winarno, 1989), menurut Beynon dan Bond (1989), secara umum pH optimum aktivitas fitase berkisar 5-8 sedangkan suhu optimumnya berkisar antara 50-80%. Sumber enzim yang berbeda menghasilkan enzim dengan kondisi aktivitas optimum yang berbeda pula. Aktivitas enzim yang beragam dipengaruhi oleh beberapa faktor, sebagai berikut:

1. Pengaruh suhu

Suhu mempengaruhi aktivitas enzim yang karena dengan meningkatnya suhu, kecepatan reaksi turut meningkat. Hal tersebut disebabkan oleh peningkatan suhu yang berdampak pada peningkatan jumlah energi pada moleku-molekul reaktan, sehingga tumbukan antar molekul persatuan waktu lebih produktif. Adanya perubahan suhu mempengaruhi konformasi enzim yang berakibatkan pada terjadinya perubahan sisi aktif dari enzim. Pada suhu ekstrim tinggi, protein mengalami

denaturasi yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur protein sehingga sisi aktif berubah dan terjadi penurunan aktivitas enzim atau bahkan menjadi tidak aktif. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui suhu optimum dari suatu enzim (Poedjiadi, 2006).

Kerja suatu enzim sangat dipengaruhi suhu lingkungannya. Setiap kenaikan suhu 10°C , kecepatan enzim akan menjadi dua kali lipat, sampai batas suhu tertentu. Enzim dan protein pada umumnya dinonaktifkan oleh suhu tinggi. Enzim berdarah panas dan manusia bekerja paling efisien pada suhu 37°C , sedangkan enzim hewan berdarah dingin pada suhu 25°C . Suhu rendah mendekati titik beku tidak dapat merusak enzim, namun enzim tidak dapat bekerja (Humang, 2013).

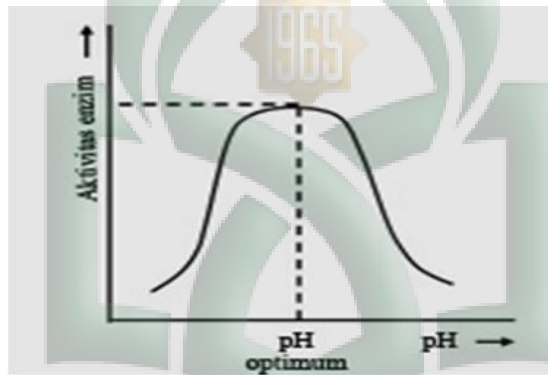


Gambar 2.1. Hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi (Poedjiadi, 2006).

2. Pengaruh pH

Enzim sebagai protein yang tersusun atas asam amino, maka semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH dalam kaitannya dengan sifat asam-basa yang berhubungan dengan protein. Karena enzim merupakan protein yang menyediakan banyak tempat pengikatan proton, karena tersusun oleh asam amino yang dapat mengadakan ionisasi mengikat dan melepaskan proton pada gugus amino, karboksil, dan gugus fungsional lainnya (Suhartono, 1989 dalam Nurjannah 2013).

Semua enzim peka terhadap perubahan pH dan nonaktifkan pada lingkungan pH sangat rendah (asam kuat) dan pH tinggi (basa kuat). Bila aktivitas enzim diukur pada pH berlainan, maka sebagian besar di dalam tubuh akan menunjukkan aktivitas optimum antara 5.5-9.0. pada pH yang jauh diluar pH optimum, enzim akan terdenaturasi. Selain itu pada keadaan ini baik enzim maupun substrat dapat mengalami perubahan muatan listrik yang mengakibatkan enzim tidak dapat berikatan dengan substrat (Humang, 2013).

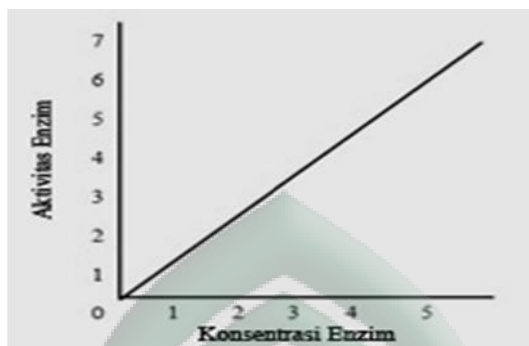


Gambar 2.2. Hubungan antara aktivitas enzim dengan pH (Poedjiadi, 2006).

3. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim yang tinggi dapat meningkatkan kecepatan reaksi akan tetapi sampai pada batas konsentrasi tertentu. Hasil hidrolisa akan konstan dengan naiknya konsentrasi enzim. Hal ini karena penambahan enzim sudah tidak efektif lagi. Bila konsentrasi substrat dibuat tetap sedangkan jumlah enzim sangat banyak maka akan terjadi penyimpangan dari ketentuan diatas, karena jumlah substrat tidak cukup untuk mencapai kecepatan maksimal. Enzim adalah reaktan yang berkombinasi dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat (ES), yang akan terurai kembali membentuk produk dan enzim bebas. Pada keadaan yang sesuai,

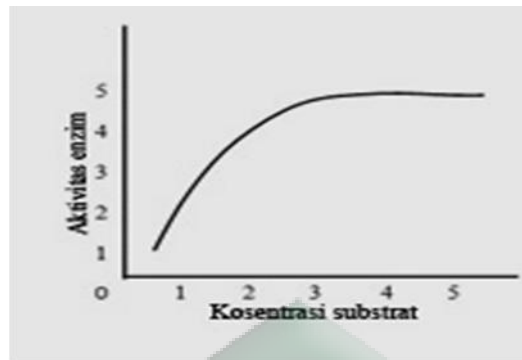
kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim sebanding dengan konsentrasi enzim (Martin dkk, 1983).



Gambar 2.3. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim (Poedjiadi, 2006)

4. Pengaruh konsentrasi substrat

Pada hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Untuk dapat terjadi kompleks enzim substrat tersebut. Diperlukan adanya kontak antara enzim dengan substrat. Kontak ini terjadi pada suatu tempat atau bagian enzim yang disebut bagian aktif. Pada konsentrasi substrat rendah, bagian aktif enzim ini hanya menampung substrat sedikit. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan enzim pada bagian aktif tersebut. Dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif telah dipenuhi oleh substrat tak jenuh dengan substrat. Bertambah besar konsentrasi kompleks substrat, sehingga jumlah reaksi-reaksi pun bertambah besar (Poedjiadi, 2006).

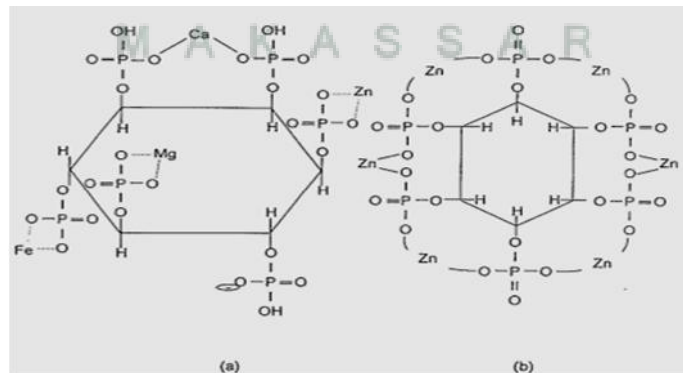


Gambar 2.4 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim (Poedjiadi, 2006)

D. Tinjauan Umum Asam Fitat

Nama kimia untuk asam fitat adalah *myo-inositol 1,2,3,4,5,6,-hexakis phosphate* dengan formula $C_6H_{18}O_{24}P_6$. Asam fitat memiliki fosfor yang bermuatan negatif yang besar sehingga asam fitat mampu berikatan dengan banyak kation divalent, protein dan karbohidrat. Garam dari asam fitat disebut *phytate* (Grafs et al, 1987 dalam Kerovuo et al, 2000).

Asam fitat secara struktural adalah cincin *myo-inositol* yang mengikat penuh 6 fosfat disekeliling cincin (Cosgrove, 1980). Rantai C dikelilingi oleh 6 atom fosfat yang berikatan dengan oksigen dan hidrogen.



Gambar 2.5 Struktur Kompleks Fitat-mineral Menurut Erdman (1979) (a) dan Scott et al dalam Wahyuni (1995) (b) dalam Indarwati (2000).

Asam fitat adalah bentuk simpangan fosfor dalam biji-bijian, merupakan garam mio-inositol asam heksakisfosfat, maupun membentuk kompleks dengan bermacam-macam kation atau protein dan mempengaruhi derajat kelarutan komponen tersebut (Piliang, 1997 dalam Wulandari, 2011).

Asam fitat merupakan senyawa yang selalu terdapat pada bahan pakan yang berasal dari tanaman dan merupakan senyawa yang tidak dapat didigestu oleh ternak monogastrik. Jika jumlah asam fitat yang tidak yang dicerna meningkatkan akan menimbulkan tambahan biaya pada pakan dengan adanya P yang tidak dicerna. Tidak terdigestasinya fitat mengakibatkan efek negatif pada digesti mineral dan protein (Maenz, 2001 dalam Nurjannah, 2013).

Asam fitat mengikat sekitar 80% P dalam biji-bijian, tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan unggas dan menurunkan nilai nutrient bahan pakan yang berasal dari tanaman pertanian (Saryska et al, 2005). Senyawa ini mampu mengikat ion mineral seperti: Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} (Pallauf et al., 1998), fosfat dan protein yang berguna bagi pertumbuhan ternak (Deshpande dan Cheryan, 1984). Ternak nonruminansia tidak mempunyai fitase pada saluran pencernaanya, sehingga kandungan senyawa fitat tidak bisa dicerna. Hal ini disebabkan karena sifat *Chelating*, sehingga senyawa fitat terbuang bersama kotoran dan mencemari lingkungan (Shin et al, 2001) dalam Nurjannah, 2013).

Asam fitat atau *myo-inositol hexakisphosphate* merupakan bentuk utama penyimpanan unsur fosfor yang terdapat pada biji-bijian, sereal, legum, dan *oilseed* (Kerovuo et al, 2000). Tanaman sereal, legume, dan *oilseeds* tersebut antarlain

kedelai (*Glycine max* L) (Raboy and Disckinson, 1993), kacang tanah (*Arachis hypogaea*) (Panhwar, 2005), batley (*Hordeum vulgare*), gandum (*Triticum aestivum*), buncis (*Phaseolus vulgaris*) (Reddy et al, 1982), padi (*Oryza sativa*), biji jagung (*Zea mays*) (O'Dell et al, 1972). Semua jenis tanaman tersebut dapat digunakan sebagai sumber pakan ternak dan banyak mengandung asam fitat. Hasil penelitian Lolaset et al (1976) menunjukkan konsentrasi asam fitat dalam kedelai memiliki sedikit variasi. Dari 15 varietas, kandungan asam fita berkisar antara 1 -1,47% dari berat kering dengan nilai rata-rat 1,14%. Sedangkan hasil penelitian Harland and Prosky (1979) menunjukkan konsentrasi asam fitat kedelai lebih tinggi 2,22 %. Hasil lebih rinci oleh Grenier dan Konietzny (2006) menunjukkan bahwa kandungan asam fitat biji kedelai dapat mencapai 9,2-16 mg/g butir. Sekitar 50-80% P dalam bungkil kedelai terikat kompleks asam fitat sehingga dapat menyebabkan masalah pencemaran lingkungan dan meningkatnya biaya pemeliharaan ternak unggas dan babi (Eeckhout dan De Paepe, 199 dalam Tyagi and Verma, 1998 dalam Knowlton et al, 2004). Hasil penelitian Glencross (2004) menunjukkan bahwa sejumlah 19,9 mg/kg P bungkil kedelai terdapat dalam bentuk kompleks asam fitat.

Asam fitat pada padi terdapat dalam lembaga (germ) dengan kandungan sebesar 7,6 g 100 g¹ dan endosperma sebesar 1,2 g 100 g¹ (O'Dell et al, 1972). Sedangkan konsentrasi asam fitat dalam padi yang terdiri dari pericarop, aleuron dan lembaga adalah sebesar 5,94 g 100 g¹ (Kasim and Edwards, 1998). Berbeda pada jagung terdapat asam fitat 80% dalam lembaga (germ). Kandungan asam fita sebesar 0,75-2,22% dari berat kering atau 3,67 mg/100g (Sokrab et al, 2011).

Tabel 2.1 kadungan asam fitat yang terdapat beberapa tanaman menurut Lot et, al. (2000) dalam Kusumadjaja (2012).

Bahan Makanan	Asam Fitat %
Jagung	0,9
Padi	0,89
Kedelai	1,4
Gandum	1,13
Kelapa	2,38
Kacang Tanah	1,9
Kacang Hijau	1,2
Kacang Koro	2,5
Kacang Arcis	1,7
Biji Bunga Matahari	1,9
Biji Wijen	5,3
Biji Kapas	4,8

Selama telah diketahui bahwa beberapa protein dari sereal dan legume membentuk ikatan antara fitat dengan protein yang dapat mempengaruhi data cerna protein. Bentuk ikatan tersebut diyakini akan menghambat degradasi enzimatik dari protein. Hasil menunjukkan bahwa asam fitat mampu menekan pemanfaatan protein atau asam amino, dengan bentuk kompleks fitat-protein sehingga perubahan menyebabkan pada struktur protein. Perubahan struktur tersebut akan mengakibatkan penurunan kelarutan protein, aktivitas enzim dan pencernaan protein (Deshpande and Damodaran, 1989, Urbano et al, 2000, dalam Greiner and Konietzny, 2011).

Menurut Wyss et al (1999) ada dua aspek yang sangat penting dari asam fitat dalam konteks nutrisi manusia dan nutrisi lemak yaitu 1). Kelompok hewan monogastrik memiliki tingkat degradasi enzim fitase yang rendah pada saluran pencernaan, dan asam fitat tidak diserap sendiri oleh tubuhnya sehingga dalam

makanan ternak perlu ditambah dengan asupan fosfat anorganik agar dapat memenuhi kebutuhan fosfat; 2). Asam fitat merupakan faktor antinutrisi. Bentuknya yang kompleks dengan protein dan berbagai macam ion logam, sehingga dapat menurunkan ketersediaan nutrisi makanan.

Sedangkan menurut Cosgrove dan Irving (1980) yang menyatakan peranan fitat pada biji-bijian sebagai berikut: 1) sumber fosfor; 2) untuk penyimpanan energi; 3) sebagai kompetitor adenosine trifosfat selama biosintesis *phytin* ketika metabolisme biji hambat dan terjadi dormansi; 4) sebagai pengerah kation *divalent* yang diperlukan untuk mengontrol proses seluler dan dilepaskan selama perkecambahan pada tanaman penghasil fitase; 5) sebagai regulator ketersediaan fosfat anorganik pada biji.

Asam fitat juga memiliki banyak manfaat bagi kesehatan, Tran (2010) menyatakan bahwa asam fitat memiliki fungsi penting sebagai antioksidan, sehingga dapat menghambat terjadinya radikal bebas dan kanker. Dua puluh persen fosfor dari bentuk asam fitat telah digunakan sebagai antioksidan dan dapat menjadi agen protektid dalam makanan manusia (Lima-Fhilo et al, 2004). Namun, asam fitat atau garam fitat merupakan inhibitor bagi enzim pencernaan seperti amilase, -amilase, lipase, pepsin, tripsin, maupun kimotripsin. Pengaruh inhibisi asam fitat atau garam fitat semakin kuat, seiring dengan meningkatnya konsentrasi fitat maupun bertambahnya gugus fosfat yang terikat pada mio-inositol (Kusumadjaja, 2009).

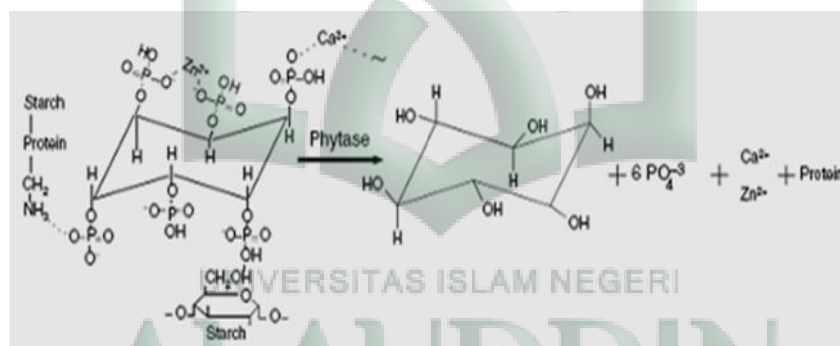
E. Tinjauan Umum Fitase

Fitase (EC.3.1.3.8) atau *myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase* pertama kali ditemukan oleh Susuki (1907) dalam penelitiannya tentang hidrolisis bekatul (Tran, 2010). *The Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry* menggolongkan dua tipe fitase yaitu 3-*Phytase* (EC.3.1.3.8): pada gugus fosfat pertama yang berikatan dengan 3-*Phytase* (EC.3.1.3.8) terdapat pada mikroorganisme dan 6-*Phytase* (EC.3.1.3.26): pada gugus fosfat pertama berikatan dengan 6-*Phytase* (EC.3.1.3.26) terdapat pada tanaman (Kerovuo et al., 2000 dalam Sari, 2012).

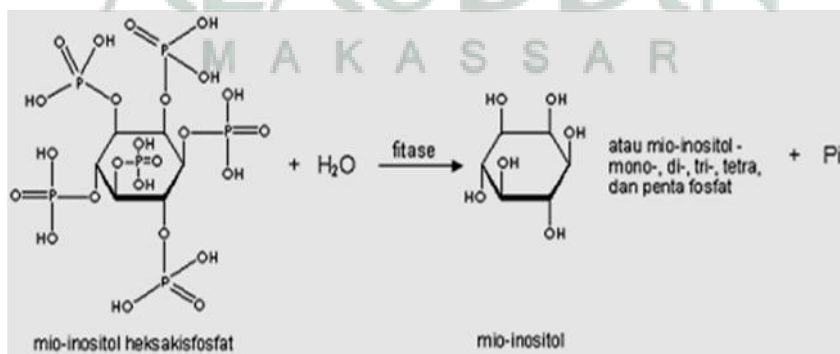
Fitase merupakan kelompok enzim phosphatase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi monophosphat organik, *myo-inositol phosphate* rendah (*lowe myo-inositol phosphate*), dan *myo-inositol* bebas. Enzim ini dapat dihasilkan oleh mikroorganisme (bakteri, jamur, *yeast*), jaringan hewan dan tanaman. Beberapa jenis tanaman yang dapat menghasilkan fitase antara lain jagung, kedelai, padi, kapas, *wheat*, dan *barley*. Pada biji legume dan sereal yang berkecambah, fitat dihidrolisis oleh fitase untuk menyediakan unsur P (Kerouvu, 2000); quan et al. 2002 dalam Nurjannah, 2013).

Fitase merupakan enzim yang berguna untuk menghidrolisis asam fitat sebagai zat antinutrisi. Hidrolisis dengan katalisator fitase pada asam fitat. Sifat antinutrisi asam fitat ini menyebabkan bahan makanan yang mengandung asam fitat sukar dicerna lambung, sehingga ion fosfat dan mio-inositol dalam bahan makanan tersebut tidak dapat digunakan oleh tubuh (Indarwati 2000 dalam Nurjannah 2013).

Fitase pada umumnya digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan ternak untuk meningkatkan kualitas nutrisi bahan pangan dan produk pakan yang mengandung fosfat, dengan cara mereduksi asam fitat. Menurut Yao et al (2011) asam fitat memiliki ikatan yang kompleks dengan pati, protein, dan mineral lain yang tidak mudah larut sehingga tidak dapat serap oleh usus. Adanya penambahan fitase akan menghidrolisi asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat organik, ion Ca^+ , Zn^+ , dan protein sehingga fosfat dan mineral yang terikat dapat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh. Lain hanya dengan Kusumadjaja et al, (2009) yang menyatakan bahwa hidrolis asam fitat oleh fitase, dengan media air akan menghasilkan mio inositol dan fosfat organik.



(a)



(b)

Gambar 2.6. Hidrolisi asam fitat oleh fitase (a) menurut Yao et al (2011) dalam Sari, 2012. (b) menurut Kusumadjaja et al. (2009)

Fitase yang berasal dari mikroorganisme semakin dapat diterima pasar untuk diaplikasikan dalam pakan, dan sangat efektif dalam meningkatkan ketersediaan fosfor bagi hewan serta mengurangi polusi yang diakibatkan oleh pelepasan fitat ke lingkungan (Kusharyoto, 2012 dalam Nurjannah, 2013).

Aktivitas enzim berhubungan langsung dengan perubahan struktur tersier dari molekul protein enzim. Pada keadaan suhu, pH, dan konsentrasi ion normal, struktur tersier distabilkan oleh 4 jenis reaksi. Interaksi tersebut ialah ikatan hidrogen, gaya tarik ion, interaksi hidrofobik, dan jembatan kovalen. Dan berbagai cara dapat dilakukan untuk meningkatkan aktivitas dan stabilitas enzim, salah satunya ialah penambahan aditif berupa ion logam (Vihinen dan Manstala, 1989 dalam Setiawihardja et al, 1997).

Ion logam sebagai aditif umumnya ditambahkan dalam bentuk garam, misalnya ion Ca^+ dalam bentuk garam klorida (Schwimmer, 1981), kation lain yang diketahui mengaktifkan enzim adalah Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , dan Al^{3+} . Ion tersebut dapat mengaktifkan enzim karena beberapa perubahan mekanis antara lain; adanya bagian yang utuh pada sisi aktif, bentuk ikatan rantai antara enzim dengan substrat, perubahan konstanta keseimbangan pada reaksi, perubahan muatan permukaan pada protein enzim, digantinya hambatan pada reaksi yang hilang, digantinya ion-ion logam yang tidak efektif dari sisi aktif atau substrat, dan keseimbangan konfirmasi dari kurang aktif diganti lebih aktif (Richardson dan Hyslop, 1985 dalam Thontowi dkk, 2001).

Mikroba penghasil fitase dapat bekerja pada rentang suhu yang lebar yaitu 35-36 °C atau 95-114 °C (Wodzinski dan Ullah, 1996). Beberapa penelitian mikroorganisme penghasil fitase yaitu *Pseudomonas* sp. (Kim et al, 2002)., *Bacillus subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992)., *Bacillus and Paenibacellus* (Khiannangam, et al. 2011)., *Aeromonas* spp. (Supreetha, 2015)., *Aerobacter aerogenes* (Yoon et al. 1996)., *Escherichia coli* (Greiner et al. 2000)., *Klebsiella aerogenes* (Sajidan et al, 2004)., *Achromobacter* sp. PB-01 (Kumar et al. 2012)., *Apergillus niger* (Liu et al, 1998)., Fungi enofit *Rhizoctonia* sp. dan *Fusarium verticilliodes* (Merlida, et al. 2010). Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Graf, 1986)., *Candida tropicalis*, *Torulpsis candida*, *Debaryomyces castelli*, dan *Kluyveromyces fragilis* (Lambrechts, 1992)., *Schwanniomyces castelli* (Segueilha, et al, 1992)., dan *Arxula adenivorans* (Sano et al, 1999).

F. Tinjauan Umum Produksi Fitase

Inokulum adalah agen hayati (*living thing*) meliputi organisme dan komponen subسلulernya. Mikroba memiliki sifat khas sehingga dapat digunakan sebagai agen untuk memproduksi bahan-bahan kimia yang diperlukan oleh manusia atau hewan ternak. Mikroba memiliki kemampuan mesintesis berbagai senyawa di alam dan juga dapat menghasilkan berbagai jenis enzim yang dapat dimanfaatkan dalam industri perngolahan makanan, bahan kimia, dan bahan fermentasi. Enzim yang dihasilkan merupakan katalisator yang mendorong terjadinya proses sintesis dan perombakan bahan baku. Mikroba industri merupakan kunci kegagalan atau

keberhasilan suatu fermentasi atau kultivasi. Kriteria mikroba industri merupakan galur murni, sifat genetik stabil, dapat menghasilkan sel vegetatif, spora atau unit-unit reproduktif lain, mampu tumbuh dengan cepat setelah diinokulasi, mampu menghasilkan produk yang diinginkan dalam waktu yang pendek dan tidak menghasilkan produk sampingan yang toksik, mampu melindungi diri dari kontaminasi (pH, suhu, inhibitor) dapat disimpan dalam jangka waktu yang panjang, galur dapat dikembangkan kualitasnya, sehingga produksinya meningkat (Nurcahyo, 2011 dalam Wardhani, 2015).

Secara umum fitase aktif pada suhu 45°C sampai 60°C dan pada suhu tertentu. Adapun bakteri penghasil fitat yaitu salah satunya *Bacillus*. Bakteri *Bacillus* dapat dengan mudah diisolasi tanah dan udara. Mikroorganisme tersebut pada umumnya dapat tumbuh dengan baik pada media nutrient yang mengandung gula, asam organik, alkohol, dan lain-lain sebagai sumber karbon utam dan asam amino sebagai nitrogen. Banyak diantara mikroorganisme dari genus *Bacillus* yang dapat memproduksi asam hidrolitik ekstraseluler yang dapat memecah polisakarida, asam nukleat, dan lemak yang menyebabkan mikroorganisme tersebut dapat menggunakan produk-produknya untuk diatur sebagai sumber karbon dan energy (Brock, 1974 dalam Nurjannah, 2013).

Enzim dibedakan berdasarkan cara dikeluarkannya yaitu enzim induktif dan enzim konstitutif. Semua enzim pada dasarnya di hasilkan di dalam sel, beberapa disekresikan melalui dinding sel dan berfungsi di luar sel. Ada dua tipe enzim berdasarkan fungsinya atau tempat kerjanya (1) enzim ekstraseluler berfungsi

melangsungkan perubahan-perubahan pada nutrien sekitarnya sehingga memungkinkan bagi nutrient tersebut memasuki sel (berfungsi di luar sel) misalnya amylase mengurangi pati menjadi unit-unit gula yang lebih kecil. (2) enzim intraseluler berfungsi mensintesis bahan seluler dan mengurangi nutrient untuk menyediakan energi yang diperlukan sel (Pelczar and Chan 1986 dalam Nurjannah, 2013).

Mikroorganisme pada umumnya dapat tumbuh dengan baik pada media nutrient yang mengandung gula, asam organik, alkohol, dan senyawa lainnya. Banyak diantara mikroorganisme dari genus *Bacillus* yang dapat memproduksi asam hidrolitik ekstraseluler yang dapat memecah polisakarida, asam nukleat dan lemak (Brock, 1974). Menurut Hussin A. S. M. et al. (2012) produksi fitase ekstraseluler oleh *Enterobacter sakazakii* ASUIA279 dioptimalkan menggunakan permukaan metodologi respon permukaan factorial penuh. Menurut A. Pandey et al. (2001) produksi fitase ekstraseluler dari bakteri *Aspergillus niger* memiliki berat molekul sekitar 10 kDa dengan menunjukka pH dan suhu optimal 5.0 dan 55 °C.

Adapun fase-fase pertumbuhan mikroorganisme dalam inkubasi yaitu:

1. Fase tenggang (*Fase Lag*)

Fase Lag merupakan fase adaptasi dan fase pertumbuhan awal. Pada fase ini dipengaruhi oleh medium dan lingkungan pertumbuhan. Kecepatan pembelahan sel masih rendah, apabila bakteri diinokulasi ke dalam medium baru, pembiakan biasanya tidak langsung terjadi tumbuh. Fase tenggang adalah periode penyesuaian

pada lingkungan dan lamanya dapat satu jam hingga mengikuti kuva logaritmik (Volk and Wheeler, 1993 dalam Nurjannah, 2013).

2. Fase eksponensial (*Fase Logaritmik*)

Fase log merupakan fase pertumbuhan cepat dan didalamnya bisa diamati ciri khas sel-sel bakteri yang aktif atau yang tumbuh dalam medium. Waktu generasi suatu mikroorganisme dapat ditentukan selama fase ini. Penentuan generasi mikroba dilakukan fase log tersebut. Artinya di luar dari fase ini tidak dapat digunakan untuk menentukan waktu generasi dan kecepatan pertumbuhan spesifik. Salah satu ciri pertumbuhan eksponensial adalah laju peningkatan sel berjalan lambat pada awal pertumbuhan lalu meningkat secara cepat dengan bertambahnya waktu (Ali, 2003 dalam Nurnajjah, 2013).

3. Fase tetap (*Fase Stasioner*)

Fase ini populasi mikroba menjadi besar dan banyak dalam medium, laju pertumbuhan berkurang dan beberapa sel mati. Apabila laju pertumbuhan sama dengan laju kematian, maka jumlah keseluruhan bakteri tetap. Dengan kata lain kecepatan tumbuh sama dengan kecepatan kematian sel (Schlegel and Schmidt, 1994). Hal ini disebabkan berkurangnya substrat, kepadatan populasi sel sangat tinggi, tekanan persial oksigen yang rendah serta adanya akumulasi produk yang toksik. Bila sel mencapai fase ini, maka laju metabolismenya menurun. Umumnya sel-sel bakteri lebih resisten terhadap tekanan lingkungan misalkan kenaikan suhu, tekanan osmotik dan tingginya konsentrasi hydrogen peroksida (Ali, 2003 dalam Nurjannah, 2013).

4. Fase Kematian

Fase ini jika pembiakan diinkubasi terus-terus menerus, setelah populasi sel mencapai fase stasioner maka tidak akan melakukan kegiatan metabolisme tetapi sel-sel justru mengalami fase kematian. Pada fase ini terjadi akumulasi toksik, nutrisi dalam medium sudah habis dan energi cadangan dalam sel habis sehingga banyak sel yang mati. Jumlah sel yang mati bertambah secara eksponensial. Dalam fase ini sel hidup hanya dapat bertahan untuk sementara, waktu generasi sangat lama bahkan tidak ada sama sekali (Stanbuty and Whitaker, 1989, dalam Nurjannah, 2013).

G. Tinjauan Umum Bakteri Endofit Burkholderia lata

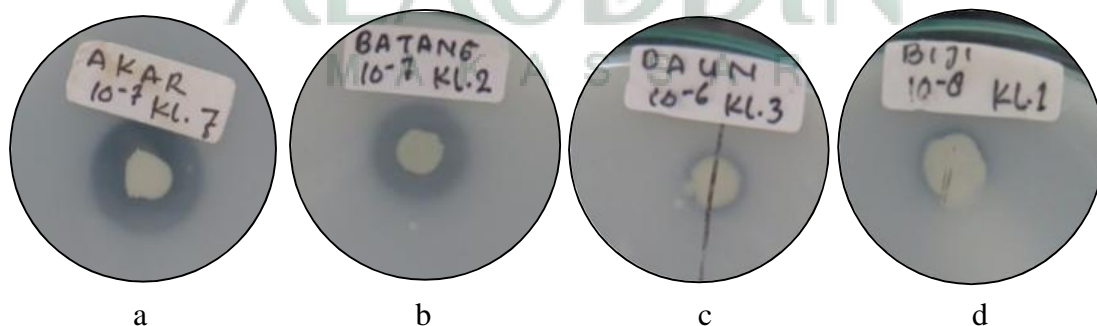
Endofit berasal dari bahasa Yunani, “Endo” berarti di dalam “Fit” (*phyte*) berarti tumbuhan. Bakteri endofit hidup di dalam jaringan vaskuler tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif. Hubungan simbiosis antara bakteri dan tumbuhan memungkinkan bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti terkandung di dalam tumbuhan inangnya (Barbara dan Christine, 2006 dalam Pratiwi, 2015).

Peranan mikroorganisme endofit dalam memacu pertumbuhan tanaman telah banyak mendapat perhatian sehingga mikroorganisme endofit dapat dimanipulasi untuk meningkatkan produktivitas tanaman jagung (Tarabily et al., 2003). Menurut Stelre et al., (1995) dalam Susilawati (2003), pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan antara lain lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, dapat diproduksi dalam skala besar, di

peroleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda (Khairani, 2009).

Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*Genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Tan, dkk. 2001). Sekitar 3000 jenis tanaman yang terbesar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur (Strobel dkk., 2003).

Seperti halnya pada penelitian Nurhikma dan Harvianti (2017) yang telah mengisolasi bakteri endofit tanaman jagung (*Zea mays*) dan diskriminasi dari setiap organ tanaman (mulai akar, batang, daun dan biji) sehingga didapatkan 4 bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi asam fitat (Ca-Fitat) dan memiliki indeks fitatik tertinggi dengan melihat aktivitas zona bening pada (gambar 2.7). Semua isolat bakteri didapatkan telah dikarakterisasi secara morfologi, uji biokimia dan diidentifikasi secara molekuler 16S rRNA.



Gambar 2.7. Zona Bening isolat (a) *Burkholderia lata*, (b) *Pantoea stewartii* subsp *indologenes*, (c) *Enterobacter ludwigii*, (d) *Enterobacter cloacae* subsp *dissolven*.

Dari ke-4 isolat bakteri endofit bahwa bakteri *Burkholderia lata* dengan kode akar 10⁻⁷ KL.7 yang memiliki indeks fitat dengan zona bening yang tinggi (IF 1,365 cm). Dengan itu bakteri *Burkholderia lata* dan pemanfaatannya masih sangat jarang dilakukan. Sampai saat ini belum pernah ada penelitian yang melaporkan bahwa *Burkholderia lata* dapat mensilkan enzim fitase sehingga hasil memberikan bukti penemuan baru bahwa bakteri *Burkholderia lata* yang diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays*) bagian akar dapat menghasilkan enzim fitase.

Genus *Burkholderia* tersebar luas diberbagai ekologi, namun paling banyak ditemukan dalam tanah dan menunjukkan interaksi *non-patogenic* terhadap tanaman. *Burkholderia* juga mampu melarutkan mineral dalam tanah dengan menghasilkan asam organik, serta meningkatkan ketersediaan nutrisi untuk tanaman sehingga sangat menjanjikan untuk dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi (Rambola et al. 2014). *Burkholderia* adalah genus bakteri endofit yang paling sering ditemui dan mampu menghasilkan senyawa bioaktif, salah satunya berpotensi sebagai senyawa antimikroba (Ryan et al., 2007).

Genus *Burkholderia* terdiri lebih dari 40 spesies yang berbeda, yang menempati beragam ekologi dialam. Genus *Burkholderia* terdapat pada tanah, air, rizosfer, tanaman, sebagai bakteri endofit pada akar dan tunas, dan juga terdapat di *miselia* jamur. Semakin banyak hubungan simbiotik genus *Burkholderia* yang dilaporkan, sifat biologis dan metabolisme *Burkholderia* dapat dimanfaatkan untuk biokontrol, pertumbuhan tanaman dan bioremediasi (Vandemme, 2006).

Bakteri Genus *Burkholderia* telah dilaporkan bertindak sebagai salah satu bakteri endofitik penting pada tanaman padi, jagung dan tebu (Mansila, 2015). Genus *Burkholderia* juga telah dilaporkan dalam penelitian (Graminho *et al*, 2015) yang menyatakan berdasarkan analisis biokimia dan genetik mengungkapkan bahwa bakteri dari genus *Burkholderia* termasuk bakteri yang dapat menghasilkan fitase.

Dari beberapa laporan mengenai bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia*, bahwa bakteri-bakteri dari genus *Burkholderia* tersebut mampu berasosiasi dengan *rhizospere* tanaman dan bakteri dari spesies ini dilaporkan juga dapat berkontribusi untuk pertumbuhan tanaman dengan membebaskan fosfat dari senyawa organik tanah seperti asam fitat (Unno *et al.*, 2005). Meskipun beberapa strain dari genus *Burkholderia* dilaporkan dapat mendegradasi asam fitat (Unno *et al.*, 2005). Akan tetapi hanya ada satu laporan yang melaporkan tentang karakteristik enzim fitase yang dihasilkan dari genus *Burkholderia* tersebut yaitu bakteri *Burkholderia* sp strain a13 (Graminho *et al.*, 2014).

Enzim murni yang dihasilkan oleh bakteri *Burkholderia* sp strain a13 menunjukkan aktivitas spesifik 174.1 U mg^{-1} . Enzim fitase yang dihasilkan dari bakteri tersebut adalah monomer. Kondisi optimal suhu dan pH bakteri *Burkholderia* sp strain a13 dalam menghasilkan enzim fitase adalah pada suhu 45-55°C dan pH 4,5. Enzim fitase dapat stabil pada suhu 4°C (Graminho *et al.*, 2014).

Burkholderia lata merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang dan merupakan bakteri aerobik. Koloni bakterinya bersifat lembab serta berpigmen kuning dan terkadang ada yang berpigmen kuning-keunguan. Bakteri ini dapat

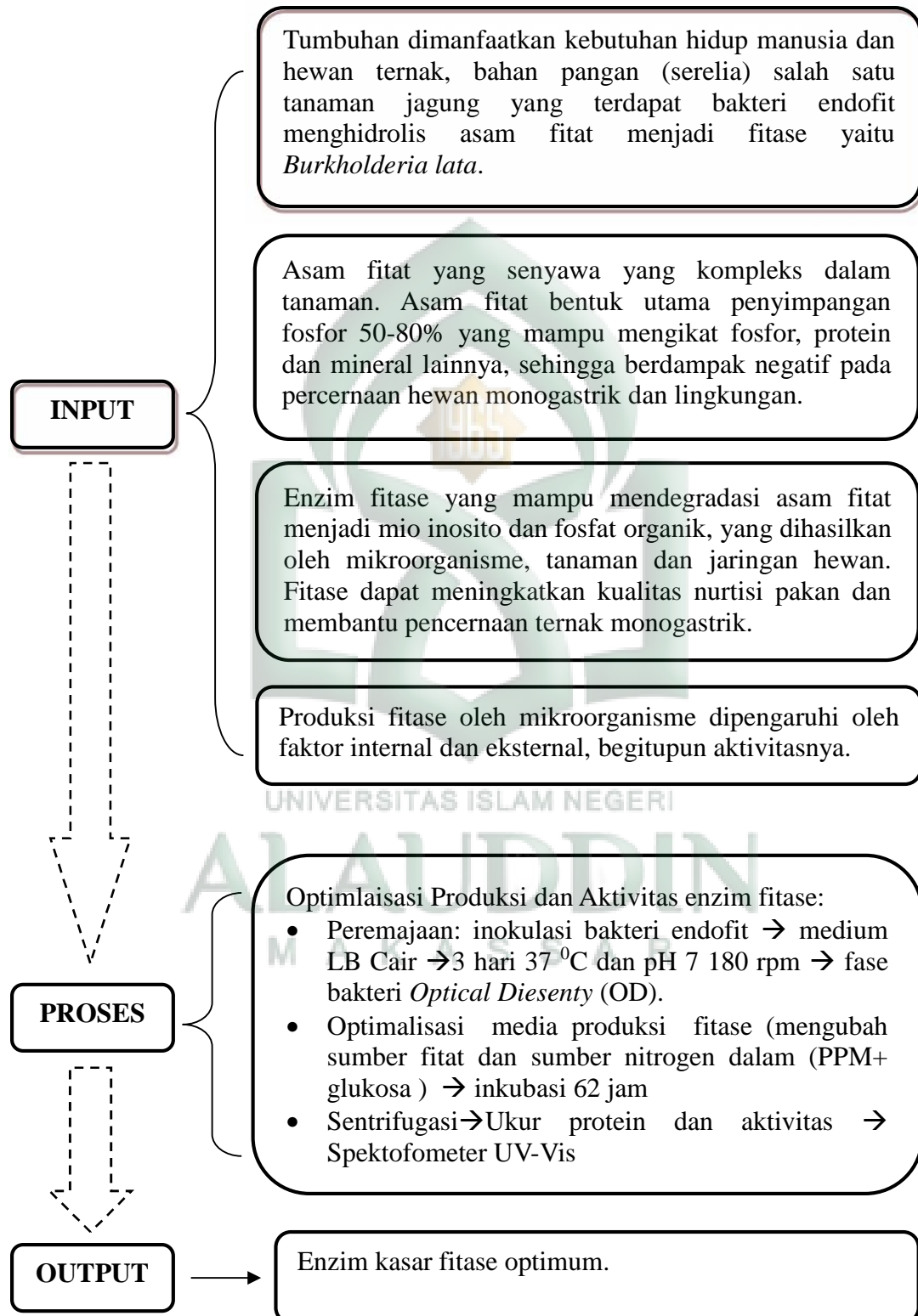
tumbuh baik pada suhu 30°C-37°C dan tidak dapat bertahan pada suhu 40°C (Vanlaere, *et al.*, 2009).

Burkholderia lata memiliki aktivitas oksidase dan lisidekarboksilase, tetapi tidak ada aktivitas tryptophanase, arginin dihidrolase atau kegiatan urease dalam metabolismenya. Beberapa strain dari *Burkholderia lata* dapat mengasimilasi D-glucosa, D-manosa, D-manitol, N-asetilglukosamin, D-Burkholderiagluco (nate, adipat, L-malat dansitrat, sedangkan asimilasi maltosa, L-arabinosa, kaprat dan phenylacetate tergantung dari strain dari *Burkholderia lata*. Pengasaman dari D-glukosa, maltosa, laktosa dan xylose sedang dalam proses pengamatan. Pengasaman dari sukrosa dan adonitol tergantung strain dari organisme ini. Reduksi nitrat tergantung strain dari organisme tersebut (Vanlaere *et al.*, 2009).

Adapun klasifikasi dari bakteri *Burkholderia lata* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Class : Beta Proteobacteria
 Order : Burkholderiales
 Family : Burkholderiaceae
 Genus : Burkholderia
 Species : *Burkholderia lata* (Vanlaere, *et al.*, 2009).

H. Kerangka Pikir



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kuantitatif dengan pendekatan deskriptif. Lokasi penelitian ini dilakukan pada laboratorium mikrobiologi fakultas sains dan teknologi universitas islam negeri (UIN) alauddin makassar Samata-Gowa.

B. Variabel Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua variabel: variabel terikat yaitu aktivitas enzim fitase, dan variabel bebas yaitu variasi sumber fitat dan sumber nitrogen.

C. Rancangan Penelitian

Penelitian ini disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor, masing - masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali yaitu:

1. Sumber fitat: Kalsium fitat (A1), bekatul padi (A2), bekatul jagung (A3), dan kedelai (A4).
2. Sumber nitrogen: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B1), Yeast Extract (B2), dan Pepton (B3).

Berdasarkan kombinasi kedua faktor tersebut diperoleh perlakuan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Fitat dan Nitrogen

Nitrogen (B) Fitat (A)	B1	B2	B3
A1	A1B1	A1B2	A1B3
A2	A2B1	A2B2	A2B3
A3	A3B1	A3B2	A3B3
A4	A4B1	A4B2	A4B3

D. Defenisi Operasional Variabel

Adapun defenisi operasional variabel, antara lain:

1. Produksi Fitase: kemampuan bakteri mendegrasi asam fitat untuk menghasilkan enzim kasar fitase dari fermentasi isolasi bakteri *Burkholderia lata* . Menggunakan media PPM (*Phytase Production Medium*) dengan pH 7, suhu inkubasi 37 °C selama 62 jam pada inkubator shaker, kemudian disentrifugasi 5000 rpm selama 35 menit suhu 4 °C.
2. Aktivitas Fitase: kemampuan fitase menghidrolisis asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat anorganik, ion Ca^+ , Zn^+ , dan protein. Jadi P anorganik yang dapat dibebaskan oleh setiap ml larutan enzim kasar fitase dalam kondisi yang ditentukan. Variasi sumber fitat dan sumber nitrogen. Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3. Sumber fitat: asam fitat merupakan substrat utama dalam penelitian ini, sehingga dilakukan variasi fitat yang digunakan, baik terdapat dalam tanaman pangan pertanian Serealia untuk memudahkan dalam produksi enzim fitase.
4. Sumber nitrogen: Nitrogen termasuk makromolekul salah satu kebutuhan utama pertumbuhan mikroba mencakup asam amino, protein, atau senyawa bernitrogen, sehingga penelitian ini menggunakan berbagai sumber nitrogen dalam membantu hidrolisis asam fitat pada produksi enzim fitase.

E. Metode Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, pengumpulan data dilakukan dengan cara observasi (pengamatan) dan purposif sampling yakni pemilihan sampel yang didasarkan dengan tujuan dan sudah di pertimbangkan dari peneliti.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah *Laminaryair flow* (LAF), *inkubator*, *oven*, *shaker inkubator*, sentrifuge dingin dan tabung sentrifuge, *magnetik stirer*, *hot plate*, vorteks, *spektrofotometer* UV-Vis Genesys 10S, autoklaf, neraca analitik, lemari es, freezer, labu takar, erlenmeyer, gelas baker, tabung reaksi, jarum inokulum/ose (ose lurus dan bulat), mikropipet, tip, botol vial, pembakar spritus, korek api, sarung tangan, corong, vortex, corong, kertas saring, rak tabung, batang pengaduk, pH meter, stopwatch dan cawan petri.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu isolat *Burkholderia lata* penghasil fitase dari endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*) koleksi dari laboratorium mikrobiologi jurusan biologi fakultas sains dan teknologi UIN Alauddin Makassar, ekstrak kasar enzim fitase, media agar miring luria bertani (LB) padat dan cair, media fermentasi atau *Phytase Production Medium* (PPM), reagen Bradford, *coomasie brilliant blue* (CBB) G-250, etanol 95%, asam fosfor 85%, larutan standar BSA (Bovine Serum Albumin), 10 ml larutan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 mengandung 2 mM Ca-fitat dan 1 mM CaCl_2 , trikloroasetat (TCA) 5%, reagen warna besi sulfat-molibdat. Bahan lainnya aluminium foil, kapas, tissue roll, es kristal, kertas saring, alkohol 96 %, alkohol 70%, plastik sils dan akuades steril, dan karet gelang.

G. Prosedur Kerja

1. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan dan disterilisasi. Alat-alat yang tidak tahan panas seperti alat gelas dibungkus dengan kertas disterilkan dalam oven suhu 160-180°C selama 2 jam. Medium, alat-alat dan bahan yang tidak tahan suhu tinggi seperti plastik disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm. Dalam pengerjaan dilakukan secara aseptik menggunakan senyawa alkohol dengan menyemprotkan ke ruangan LAF. Sedangkan alat dari logam seperti ose atau jarum inokulu disterilkan pada lampu spritus.

2. Pembuatan media produksi fitase

- a. Media pertumbuhan yang Luria Bertani (LB) padat yang komposisinya: bakto agar 2% pepton 1%, yeast extract 0,5%, dan NaCl 1%. Sedangkan pembuatan LB cair tidak ditambahkan bakto agar (El. Toukhy et al. 2013 dan kusumadjaja 2009).
- b. Media produksi fitase PPM (*Phytase Production Medium*) modifikasi dari media PSM (*Phytase Skreening Medium*) yang komposisinya: glukosa 1,5%, NH_4SO_4 0,5%, KCl 0,05%, MgSO_4 0,05%, NaCl 0,01%, CaCl_2 0,001, FeSO_4 0,001%, MnSO_4 0,001, dan Ca-fitat 0,5% sebagai induser asam fitat (Singh NK et. al, Kerovuo, 1998 dan El. Toukhy et al. 2013).
- c. Semua media dihomogenkan menggunakan hot plate dan stirrer, lalu mengatur pH media menjadi 7 dengan menggunakan NaOH dan HCl, kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm

3. Peramajaan dan penentuan kurva pertumbuhan bakteri

a. Peremajaan bakteri

Bakteri yang akan diremajakan untuk stok kultur, diambil 1 ose isolat murni *Burkholderia lata* kemudian digoreskan pada media agar miring Luria Bertani (LB) padat steril, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

b. Penentuan kurva tumbuh bakteri

Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara mengukur kerapatan optik (*Optical Density OD*). Stok kultur bakteri *Burkholderia lata* diinokulasi dalam media 150 mL

LB cair sebanyak 5 ose isolate, kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* diagitasi 180 rpm pada suhu 37°C. Nilai OD diukur dengan interval 2 jam diawali dari 0 jam dengan mengambil 2 ml kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm sampai memperoleh satu seri OD yaitu metode turbidimetrik, sehingga didapat kurva standar pertumbuhan yang merupakan hubungan antara jumlah sel per milliliter dengan nilai OD, blanko dibuat medium steril (Wang et al., 2004 dalam Kusumadjaja 2009).

4. Produksi ekstrak kasar enzim fitase

Produksi ekstrak kasar fitase dilakukan dengan cara yaitu sebagai berikut:

a. Pembuatan starter bakteri

Pembuatan starter diawali dengan cara 5 ose isolat *Burkholderia lata* dari medium agar miring diinokulasikan ke dalam medium 150 mL LB cair baru kemudian diinkubasi pada inkubator shaker dengan diagitasi 180 rpm pada suhu 37°C sampai bakteri mencapai fase stasioner yaitu 62 jam dan di simpan sebagai starter pada saat produksi fitase.

b. Produksi Enzim

Sebanyak 5 ml starter bakteri diinokulasi pada variasi produksi (PPM) 100 ml kemudian dinkubasi pada *shaker incubator* 180 rpm selama 3 hari dari fase stasioner (62 jam) kurva tumbuh bakteri dengan suhu 37°C (Muthuraman, 2013 dan Singh et al, 2013). Kultur sel-sel bakteri yang telah diinkubasi dipisahkan dari medium dengan cara diambil 10 ml kemudian disentrifugasi 5000 rpm selama 35 menit pada suhu 4°C, Lalu diperoleh 2 bagian yaitu supernatan dan pelet/endapan. Supernatan

berbentuk cair yang terdapat bagian atas merupakan ekstrak kasar enzim (Ekstraseluler). Supernatan yang diperoleh diukur kadar protein dan uji aktivitasnya. Pengukuran kadar protein untuk memastikan bahwa enzim bagian dari protein dan mengetahui kadar protein supernatant tersebut. Setelah itu di uji aktivitasnya dilakukan untuk mengetahui kerja enzimatik pada supernatant (El-Touky et al, 2013 dan Kusumadjaja, 2012).

5. Penentuan kadar protein dengan metode Bradford

a. Pembuatan reagen bradford

Ditimbang 0,1 g *Coomessie Brilliant Blue* (CBB) G-250 kemudian dilarutkan dalam 50 ml etanol 96 % (v/v), lalu ditambahkan 100 ml asam fosfat 85% (v/v). dan diencerkan mencapai 1 liter. kemudian campuran dihomogenkan sampai merata lalu disaring dengan kertas saring, penyaringan diulang beberapa kali untuk memisahkan komponen pereaksi yang berwarna biru. Pereaksi bradford harus berwarna coklat muda bening dan di simpan dalam botol gelap pada suhu rendah 4°C (Bintang, 2010).

b. Pengukuran kurva standar protein

Ditimbang 0,01 g *Bovine Serum Albumin* (BSA) kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquadest steril lalu divorteks untuk menghomogenkan sehingga diperoleh larutan induk BSA artinya sudah konsentrasi 1000 ppm. Untuk membuat konsentrasi 100 ppm, Larutan induk diencerkan diambil 0,5 ml dan ditambahkan 4,5 ml aquadest steril sehingga diperoleh larutan stok BSA 100 ppm. Dari larutan stok tersebut dibuat lagi deret standar protein dengan konsentrasi 0, 5, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm

menggunakan rumus pengenceran $M1.V1 = M2.V2$ dimasukkan dalam tabung yang berbeda, Kemudian masing-masing seri deret standar diambil 0.1 ml tabung yang berbeda lalu masing-masing ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford, lalu divorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama ± 10 menit. Pereaksi bradford memberikan efek warna biru untuk mendeteksi adanya protein dan di ukur absorbansinya pada spektrofotometer panjang gelombang 595 nm dan sebagai blanko adalah 0 ppm. Penentuan kurva standar menggunakan regresi linear, yang di dapatkan dari persamaan matematik larutan standar protein dan nilai absorbansi standar yang akan digunakan pengukuran kadar protein pada sampel.

c. Pengukuran sampel

Sampel diambil 0,1 ml ekstrak kasar enzim dan ditambahkan 5 ml reagen Bradford, lalu divortex dan didiamkan ± 10 menit. Absorbansi larutan sampel protein diukur pada panjang gelombang 595 nm dan dibuat blanko dari 0 ppm standar protein. Dengan persamaan matematik dari kurva standar protein, akan didapatkan kadar protein terlarut yang terkandung dalam larutan ekstrak kasar enzim (supernatant).

6. Penentuan aktivitas fitase dengan kadar fosfat

a. Pembuatan reagen warna besi sulfat-molibdat biru

Pembuatan reagen ini dilakukan dengan cara membuat larutan yang berbeda:

- 1) Ditimbang 7,5 g amonium molybdat dilarutkan dalam 400 ml aquadest steril, kemudian dihomogenkan dan perlahan-lahan ditambahkan 22 ml asam sulfat (H_2SO_4), lalu diencerkan mencapai 500 ml dengan aquadest steril sehingga terbentuk

warnanya hijau (stok amonium molybdat). 2) ditimbang 2,7 g FeSO_4 dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril sehingga terbentuk warna kuning (Stok Besi Sulfat). Masing larutan di simpan pada botol gelap dan suhu rendah 4 °C sampai 1 bulan. Pembuatan pereaksi warna molybdat kedua larutan dicampur amonium molibdat dan besi sulfat dengan perbandingan 4:1 (Muthurama et al. 2013 and Shimizu, mikio 1992).

b. Pengukuran kurva standar fosfat

Ditimbang 0,3834 g kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) di larutkan dalam 100 ml aquadest steri sebagai larutan induk dengan konsentrasinya 1000 ppm. Kemudian encerkan lagi dalam 100 kali. Jadi 10 ml larutan induk diencerkan dengan aquadest steril mencapai 100 ml sebagai larutan standar dengan konsentrasi 10 ppm mengandung 0,03834 g.

Setiap kurva standar dibuat dengan diambil 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, dan 4 ml larutan fosfat standar, masing-masing dimasukkan dalam setiap labu erlenmeyer kemudian ditambahkan 6,25 pereaksi warna molybdat. Larutan dihomogenkan dan didiamkan selama ± 10 menit pada suhu ruang. Lalu masing-masing diencerkan dengan aquades steril sampai volume mencapai 25 ml. kemudian ukur absorbansi pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm

c. Pengukuran aktivitas sampel

Sampel diambil 0,15 ml supernatan inkubasi dengan substrat 0,6 ml larutan buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 yang mengandung 2 mM Ca-Fitat dan 2 mM CaCl_2 pada suhu 37°C selama ± 30 menit. Setelah diinkubasi reaksi dihentikan dengan

ditambahkan 0,75 TCA 5%, dan terakhir ditambahkan 1,5 ml reagent warna molybdat. kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 700 nm (Shimizu, 1992., Muthuraman et al, 2013., Singh NK et. al, 2013., El Toukhy, et. al, 2013., Selvamohan T. et. al, 2012., Sajidan, 2000 dan Hussin, 2102).

7. Optimalisasi produksi aktivitas ekstrak kasar enzim fitase

Dilakukan hal yang sama pada produksi fitase dengan mengubah komposisi media PPM sumber substart fitat Ca-Fitat 0,5% dan sumber nitrogen ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%. Variasi yang digunakan diganti sumber substrat fitat alami tanaman pangan sereal yang mempunyai kandungan asam fitat tinggi dan banyak digunakan dalam susunan ransum pakan unggas yaitu bekatul padi, bekatul jagung, dan kedelai. Sedangkan variasi sumber nitrogen yaitu yeast extract dan pepton dengan konsentrasi tetap. Dinkubasi pada inkubator shaker diagitasi 180 rpm dengan suhu 37°C selama fase stasioner kurva tumbuh bakteri (62jam).

H. Teknik Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik yang dianalisa secara deskriptif. Aktivitas fitase dinyatakan Satu unit enzim fitase (UI) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol (μM) fosfor anorganik (P_i) per menit pada kondisi pengujian.

Pengukuran aktivitas fitase dan kadar protein ditentukan dengan cara substitusi data absorbansi ke dalam persamaan regresi linear dari kurva larutan

standar. Kurva larutan standar didasarkan pada data larutan standar protein albumin (BSA) dengan panjang gelombang 595 nm dan data larutan standar fosfat (KH_2PO_4) dengan panjang gelombang 700 nm.

Dimana: $y = ax - b$

Keterangan:

$$x = \left(\frac{y + b}{a} \right)$$

y = Absorbansi

x = aktivitas fitase (U/mL) dan kadar protein (mg/mL)



BAB IV

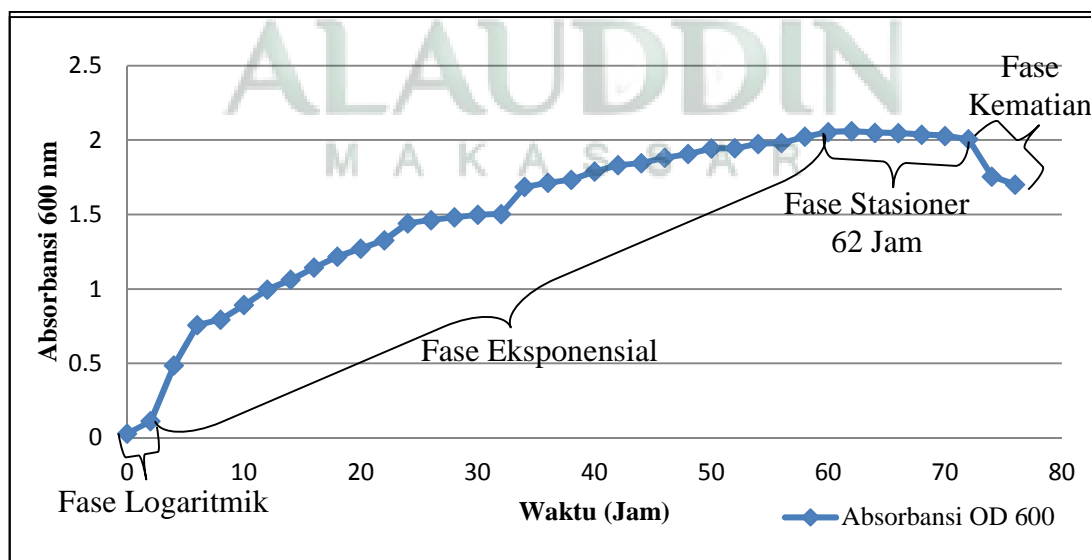
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan satu isolat bakteri untuk memproduksi fitase yaitu *Burkholderia lata* strain HF penghasil fitase yang berasal bakteri akar endofit tanaman jagung (*Zea mays*) Bakteri tersebut dipilih berdasarkan penelitian Nurhikma dan Harvianti (2017) bahwa bakteri *Burkholderia lata* dengan kode akar 10⁻⁷ KL.7 yang memiliki indeks fitat dengan zona bening yang tinggi (IF 1,365 cm). Penamaan bakteri tersebut diubah karena berdasarkan hasil blast menunjukkan bahwa analisi gen hanya memiliki kemiripan 98% bakteri *Burkholderia lata* strain 383, artinya bakteri tersebut tidak 100% sama dengan bakteri *Burkholderia lata* strain 383 karena adanya gen-gen yang berbeda atau adanya mutasi gen sehingga urutan basa nukleutidanya berbeda. Selain itu, bakteri tersebut pemanfaatannya masih sangat jarang dilakukan. Sampai saat ini belum pernah ada penelitian yang melaporkan bahwa bakteri yang ditemukan dapat mengasilkan enzim fitase sehingga hasil memberikan bukti penemuan baru bahwa bakteri yang diisolasi dari tanaman jagung (*Zea mays*) bagian akar dapat menghasilkan enzim fitase dan sampel yang diambil dari Balai Pertanian Tanaman Serealiala Kab. Maros Sulawesi Selatan. maka nama bakteri yang digunakan adalah *Burkholderia lata* strain HF. Simbol HF itu sendiri berdasarkan nama Hafsani, S.Si., M.Pd. pembimbing dari penelitian yang mengisolasi bakteri endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*).

1. Kurva tumbuh bakteri *Burkholderia lata* strain HF

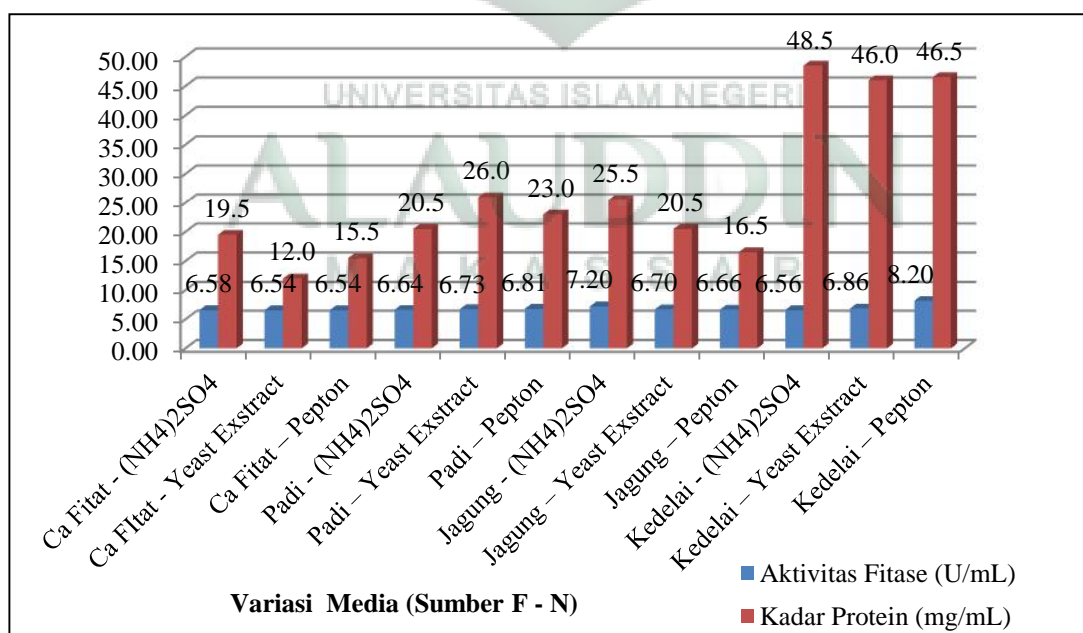
Perbuatan kurva pertumbuhan bakteri diperlukan untuk menentukan waktu pertumbuhan yang tepat pada tahap produksi. dengan ini dapat diketahui waktu inkubasi bakteri *Burkholderia lata* agar menghasilkan enzim fitase dalam jumlah optimal dan aktivitas yang tinggi. Pertumbuhan bakteri diamati dengan mengukur kerapatan optik OD (*Optical density*) pada medium Luria Bertani (LB) dengan interval waktu tertentu, sehingga didapat nilai OD yang konstan. Nilai OD yang konstan menunjukkan bahwa pertumbuhan sel bakteri tersebut telah mencapai pada fase stasioner, dimana pada fase ini tampak pada (Gambar 4.1) artinya pertumbuhan selnya tetap dimana sel yang mati sama dengan jumlah sel hidup. Bakteri *Burkholderia lata* strain HF dinokulasi pada medium LB kemudian diagitasi pada inkubator shaker 180 rpm suhu 37 °C. Pengukuran OD dengan interval 2 jam. Penentuan kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan membuat tabel antara waktu inkubasi terhadap absorbansi OD, maka diperoleh grafik sebagai berikut:



Gambar 4.1 Kurva tumbuh *Burkholderia lata* yang konstan yaitu di jam 62

2. Optimalisasi produksi dan aktivitas fitase terhadap variasi media *Burkholderia lata* strain HF

Penelitian ini mengoptimalkan produksi fitase pada variasi media PPM (*Phytase Production Medium*) sumber fitat dan sumber nitrogen. Tujuan optimalisasi untuk mengetahui media yang memiliki aktivitas yang tinggi dalam produksi fitase dan dilakukan 2 kali ulangan. Penelitian ini diawali dengan pembuatan starter bakteri dengan cara bakteri diremajakan pada medium LB cair yang diinkubasi sampai fase stasioner (62 jam) dari hasil kurva tumbuh bakteri *Burkholderia lata* strain HF, kemudian 5 mL starter dinokulasi pada variasi medium PPM. Kemudian diinkubasi pada inkubator shaker 180 rpm suhu 37 °C selama 62 jam, setelah diinkubasi diambil 10 mL hasil fermentasi, lalu disentrifugasi 5000 rpm selama 35 menit dan didapatkan supernatant yang merupakan ekstrak kasar fitase, kemudian diukur kadar protein dan aktivitas fitase, maka diperoleh hasil yang optimum pada grafik sebagai berikut:



Gambar. 4.2 Aktivitas Fitase dan kadar protein *Burkholderia lata* terhadap variasi media (sumber fitat dan sumber nitrogen)

B. Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian Nurhikma dan Harvianti (2017) bahwa bakteri *Burkholderia lata* strain HF memiliki ciri-ciri bentuk *coccus* dan termasuk bakteri bersifat gram negatif (-). Hasil molekuler analisis gen 16S RNA: bakteri endofit akar 10^{-7} kl.7 asal tanaman jagung (*Zea mays*) bahwa memiliki kemiripan 99% dengan spesies bakteri *Burkholderia lata* dengan strain HF, dimana bakteri tersebut sebagai penghasil fitase yang pertama.

1. Pertumbuhan bakteri *Burkholderia lata* strain HF

Setiap mikroorganisme memiliki fase pertumbuhan yang berbeda, tergantung jenis strain mikroorganisme itu sendiri. Media pertumbuhan merupakan substrat yang terdiri atas campuran nutrisi yang diperlukan pertumbuhan mikroorganisme. Umumnya mengandung nutrisi seperti air, sumber energi, nitrogen, sulfur fosfat, oksigen, hidrogen, serta mineral. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi yang disediakan dari media berupa molekul-molekul yang selanjutnya dirakit untuk menyusun komponen sel dan memperbanyak diri sehingga sel-sel tersebut dapat dimanfaatkan. Adanya media pertumbuhan dapat dilakukan isolasi mikroorganisme menjadi kultur tunggal dan juga memanipulasi mikroorganisme yang didapatkan untuk kepentingan tertentu (Hafsan, 2014)

Pada penelitian ini membuat kurva pertumbuhan bakteri untuk menentukan waktu inkubasi bakteri *Burkholderia lata* pada saat produksi enzim fitase. Dilakukan kurva pertumbuhan bakteri dengan mengamati dan mengetahui kekeruhan sel bakteri yang terdapat dalam larutan media secara turbidimetri. Pengukuran secara

turbidimetri dilakukan dengan mengukur kekeruhan media menggunakan spektrofotometer. Bakteri yang bermultifikasi pada media cair akan menyebabkan media menjadi keruh. Pada pengukuran spektrofotometer digunakan dengan cara memabandingkan densitas optik (*optical density* OD) antara media tanpa pertumbuhan bakteri dan media dengan pertumbuhan bakteri. Secara pembacaan spektrofotometer, cahaya yang dapat mengenai sel-sel bakteri dalam suspensi akan dihamburkan, sedangkan cahaya yang lolos akan terbaca pada galvanometer, Sehingga semakin sedikit jumlah sel bakteri dalam suspensi, maka semakin besar intensitas cahaya yang lolos dan semakin tinggi pula absorbansinya atau kerapatan optik (OD) yang didapat (Pratiwi, 2008). Penelitian ini mengamati pertumbuhan sel bakteri *Burkholderia lata*, sebanyak 5 ose yang diinokulasi pada media 150 mL luria bertani (LB) secara aseptis kemudian diinkubasi pada inkubator shaker dengan diagitasi 180 rpm dan suhu 37°C, lalu pengukuran dilakukan secara turbidimetri OD 600 nm dengan interval 2 jam. Pada panjang gelombang 600 nm merupakan suspensi cair kerapatan optik maksimum pada bakteri *Burkholderia lata*. Hal ini juga berdasarkan panjang gelombang 600 nm bakteri *Bacillus subtilis* MJA Wang et al, 2004 dalam El Toukhy et al 2013.

Secara umum bahwa siklus pertumbuhan bakteri ada 4 fase yaitu fase lag, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan *Burkholderia lata* gambar 4.2 dan data absorbansi terlampir (lampiran 10). Fase lag atau fase tenggang adalah fase penyesuaian mikroorganisme pada lingkungan baru, ciri-cirinya yaitu tidak adanya peningkatan jumlah sel, yang ada

hanya peningkatan ukuran sel. Lama lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal mikroorganisme dan media perumbuhan (Pratiwi, 2008). Sedangkan menurut Volk and Wheeler (1993) fase tenggang adalah periode penyesuaian pada lingkungan dan lamanya dapat satu jam hingga mengikuti kuva logaritmik. Hal ini dibuktikan dengan nilai OD yang didapat fase lag terjadi pada 0 jam sampai 2 jam ini, yakni pertumbuhan sel bakteri *Burkholderia lata* sedikit karena bakteri tersebut masih dalam tahap beradaptasi pada medium baru sehingga nilai hasil OD kecil 0,031 log/sel sampai 0,114 log/sel.

Fase logaritmik terjadi setelah melewati jam 2 sampai dengan 62 jam, sel bakteri dari awal lambat dan sedikit lalu meningkat lebih cepat dan lebih besar, karena *Burkholderia lata* masih perlu untuk tumbuh dan beradaptasi pada medium baru. Hal ini dibuktikan nilai OD terus meningkat dari 0,488 log/sel menjadi 2,060 log/sel. Menurut Ali (2003) laju peningkatan sel berjalan lambat pada awal pertumbuhan lalu meningkat secara cepat dengan bertambahnya waktu. Sedangkan menurut Pratiwi (2008) bahwa fase log merupakan fase dimana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikroorganisme, sifat media dan kondisi pertumbuhan. Sel yang baru terbentuk dengan laju konstan dan massa yang bertambah secara eksponensial.

Pertumbuhan bakteri terus berlangsung sehingga didapat Fase stasioner (tetap) dari 62 jam sampai 72 jam sel bakteri *Burkholderia lata* telah mencapai pembelahan dan pertumbuhan paling tinggi dan konstan. Menurut Fase ini populasi mikroba menjadi besar dan banyak dalam medium, laju pertumbuhan berkurang dan

beberapa sel mati. Apabila laju pertumbuhan sama dengan laju kematian, maka jumlah keseluruhan bakteri tetap. Dengan kata lain kecepatan tumbuh sama dengan kecepatan kematian sel (Schlegel and Schmidt, 1994). Fase ini juga pertumbuhan bakteri berhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel bakteri yang membelah sama dengan jumlah sel bakteri yang mati, kemudian mengalami pergantian sel sehingga terdapat kehilangan sel yang lambat karena diimbangi oleh pembukan sel-sel baru melalui pertumbuhan dan pemberlahan dengan nutrisi yang dilepas oleh sel-sel yang mati karena mengalami lisis. Hal ini dibuktikan dengan awal fase stasioner nilai OD dari jam 62 nialai 2,060 log/sel, kemudian mengalami penurunan dijam 72 dengan nilai 2,007 log/sel.

Sel bakteri *Burkholderia lata* yang terus membelah sehingga terjadi mutasi dan mengalami lisis telah memasuki fase kematian dari jam 72 sampai jam 76 nilai OD terus menurun artinya jumlah sel bakteri *Burkholderia lata* mati meningkat karena ketersediaan nutrisi kurang dan akumulasi produk buangan yang bersifat toksik atau racun dengan nilai yang dapat dari 2,007 log/sel menjadi 1,702 log/sel. Menurut Stanbuty and Whitaker, (1989) fase ini terjadi akumulasi toksik, nutrisi dalam medium sudah habis dan energi cadangan dalam sel habis sehingga banyak sel yang mati. Jumlah sel yang mati bertambah secara eksponensial. Dalam fase ini sel hidup hanya dapat bertahan untuk sementara, waktu generasi sangat lama bahkan tidak ada sama sekali.

Jadi awal fase stasioner dijadikan waktu inkbuasi dan diremajakan *Burkholderia lata* sebagai starter pada saat produksi fitase, maka waktu inkubasi

yang tepat dapat dilihat gambar 4.1 yaitu di jam 62 jam dengan nilai OD 2,060 log/sel, karena waktu tersebut pertumbuhan sel bakteri terbentuk dengan laju konstan dan belum terjadi akumulasi produk buangan yang bersifat toksik. Menurut Pratiwi (2008) bahwa menghasilkan metabolit sekunder dari mikroorganisme diproduksi selama fase stasioner. Metabolit sekunder tidak diproduksi pada saat pertumbuhan sel secara cepat (fase logaritmik), tetapi biasanya disintesis pada akhir siklus pertumbuhan sel, yaitu fase stasioner saat populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Metabolit sekunder merupakan suatu molekul atau produk metabolik yang dihasilkan pada proses metabolisme sekunder mikroorganisme. Metabolit sekunder dibuat dan disimpan secara ekstraseluler. Berbeda dengan halnya dengan metabolit primer yang di buat secara intraseluler. Metabolit primer diproduksi pada waktu yang sama dengan pembentukan sel baru dan kurva produksinya mengikuti kurva pertumbuhan populasi secara paralel (logaritmik). Maka enzim fitase didapatkan enzim dari hasil metabolit sekunder *Burkholderia lata* yaitu ekstraseluler (enzim kasar fitase). Menurut Nurjannah (2013) bahwa awal fase stasioner waktu yang tepat untuk mengisolasi enzim yang dihasilkan bakteri. Sedangkan menurut Konieczny dan Greiner (2004) dalam Merlinda (2010) bahwa sintesis fitase dari mikroorganisme adalah pada fase awal stasioner mencapai puncak produksi pada akhir fase stasioner. Menurut Husseinkhani (2009) bahwa produksi ekstrak enzim dalam tahap akhir dari pertumbuhan eksponensial artinya awal fase stasioner.

2. Optimalisasi produksi dan aktivitas fitase terhadap variasi media *Burkholderia lata* strain HF

a. Produksi Enzim fitase

Penelitian ini diawali dengan peremajaan bakteri pada medium LB cair dan diinkubasi sampai fase stasioner yaitu 62 jam, kemudian diinokulasi ke media produksi fitase PPM (*Phytase Production Medium*) hasil dari modifikasi media PSM, glukosa sebagai sumber karbon tetap, kemudian perlakuan penelitian ini mengubah sumber fitat dan nitrogen, kemudian menggunakan pH media 7, lalu diinkubasi pada inkubator shaker dengan kecepatan 180 rpm dengan suhu 37°C selama 62 jam. Pada kondisi tersebut berdasarkan pada penelitian sebelumnya Nurhikmah (2017) isolasi dan skrining bakteri *Burkholderia lata* dari akar tanaman jagung (*Zea mays*) menggunakan media PSM (*Phytase Screening Medium*) dengan pH 7 pada suhu inkubasi 37°C selama fase stasioner dijam 62. Menurut Vanlaere, *et al.* (2009) bakteri *Burkholderia lata* dapat tumbuh baik pada suhu 30°C-37°C. Pada kondisi tersebut juga berdasarkan beberapa penelitian menurut Yoo *et al* (1996) dalam Nurjannah (2013) bahwa produksi fitase bakteri *Enterobacter* sp. pada medium PSM mencapai kondisi optimum pada pH 5,5 dan fermentasi selama 3 hari dalam suhu 37°C dengan aktivitas fitase didapat pada fraksi ekstraseluler. El-Toukhy *et al* (2013) *Bacillus subtilis* MJA mempunyai kondisi optimum produksi enzim fitase dengan pH 7, suhu 37°C dan agitasi 200 rpm selama 4 hari. Muthuraman *et al* (2013) *Pseudomonas fluorescens* mempunyai kondisi optimum produksi enzim fitase dengan pH 6, suhu 28 °C, dan agitasi 180 rpm selama 24 jam. Singh Nk *et al* (2013) bahwa *Bacillus subtilis* DR6 mempunyai kondisi optimum produksi enzim fitase dengan pH 6.5, suhu

optimum 50°C, dan diagitasi 200 rpm selama 3 hari. Selvamohan et al (2012) bahwa *Pseudomonas* sp. mempunyai kondisi optimum produksi enzim fitase dengan pH 5, suhu 37°C, dan agitasi 150 rpm selama 3 hari. Hussin A. S. M. et al (2012) bahwa *Enterobacter sakazakii* ASUIA279 mempunyai kondisi optimum produksi enzim fitase dengan pH 7 dan suhu 37°C, dan 200 rpm selama 18 jam agitasi. Menurut Widowati (2000), bahwa *Bacillus coagulans* E1.4.4. mempunya kondisi optimum produksi enzim fitase pada pH 6,8, suhu 37 °C, dan agitasi 175 rpm selama 20 jam.

Pada penelitian ini menggunakan glukosa sebagai sumber karbon tetap pada media produksi (PPM). Menurut Hafsan (2014) Sumber karbon merupakan kebutuhan nutrisi utama bagi mikroorganisme, umumnya mengandung karbon molekul organik seperti karbohidrat, lemak, protein yang terdapat pada glukosa. Menurut Poedjiaji (1994) Glukosa termasuk golongan monosakarida yaitu karbohidrat sederhana yang molekulnya hanya terdiri satu sakarida atau beberapa atom karbon saja dan tidak dapat diuraikan dengan cara menghidrolis dalam kondisi lunak menjadi karbohidrat lain. Menurut Hassouni et al, 2006 dalam Awad et al (2013) glukosa dimanfaatkan langsung oleh mikroorganisme tanpa harus dihidrolisis terlebih dahulu atau diurai. glukosa dianggap sebagai sumber karbon sederhana dan mudah diurai. Hal ini juga menurut Nurhikma (2017) bahwa dalam uji biokimia bakteri *Burkholderia lata* positif dapat memfermentasi glukosa dan menurut Vanlaere et al. (2009) *Burkholderia lata* dapat mengasimilasi D-glukosa. Menurut Greiner, (2007) dalam Kanpiengjai (2013) bahwa Ekspresi enzim dalam degradasi asam fitat bergantung pada sifat sumber karbon, PH awal dan suhu yang digunakan untuk

pertumbuhan mikroorganisme. Kehadiran glukosa menyebabkan tingginya aktivitas degradasi phytate pada *E. coli* (Touati et al., 1987) dan *Lactobacillus amylovorus* (Sreemulu et al., 1996). Menurut beberapa penelitian penggunaan glukosa sebagai sumber karbon yang optimum dalam produksi fitase seperti *Bacillus subtilis* DR6 (Singh NK et al. 2013), *Bacillus subtilis* MJA (El-Toukhy et al, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* P6 (B. Sasirekha et al, 2012), *Penicillium purpurogenum* (Sano et al, 1999), *Aspergillus adenivoran* (Quan et al, 2001), *Candida krusei* dan *Aspergillus niger* (Soni and Khire, 2007 dalam Awad et al 2013), dan *Bacillus amyloliquefaciens* CH3-1 (Khianngam et al, 2011).

Pengubahan dan perlakuan penelitian ini yaitu sumber fitat dan sumber nitrogen. Sumber fitat yang digunakan sebagai substrat yaitu asam fitat alami yang terkandung dalam tanaman sereal dan digunakan dalam ransum pakan ternak seperti jagung, kedelai dan bekatul padi memiliki kandungan asam fitat yang tinggi. Penggunaan substrat tersebut agar mempermudah memproduksi fitase dan dapat dijangkau selain itu harganya murah dibandingkan penggunaan substrat Ca-Fitat yang harganya mahal dan susah dijangkau. Sedangkan penggunaan sumber nitrogen untuk melihat pengaruh pertumbuhan bakteri dalam membantu memproduksi fitase. Penelitian menggunakan desain rancangan acak lengkap masing-masing variasi sumber fitat: kalsium (Ca) fitat, bekatul padi, bekatul jagung, dan kedelai. Sumber nitrogen: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract, dan pepton.

Setelah inkubasi, medium fermentasi PPM disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 35 menit dengan suhu 4 °C, hasilnya terbentuk dua lapisan yaitu

supernatant berupa cairan (ekstraseluler) dan pellet berupa endapan (intraseluler). Supernatant merupakan enzim kasar fitase dari hasil metabolit sekunder *Burkholderia lata* strain HF, kemudian supernatant diukur kadar protein dan diuji aktivitas fitase. Selama fermentasi dengan memanfaatkan asam fitat yang terdapat pada media PPM dengan melakukan proses metabolisme sebagai kebutuhan nutrisi atau fosfat, sehingga menghasilkan dan mengeluarkan senyawa atau produk metabolik diluar sel yang berupa cairan disebut metabolit sekunder. Penggunaan sentrifugasi untuk memisahkan komponen molekul yang berukuran berat dan sel bakteri dengan senyawa produk yang dihasilkan sehingga terbentuk endapan. Menurut Pratiwi (2008) sentrifugasi adalah teknik pemisahan suatu bahan berdasarkan berat molekul dengan kecepatan tertentu. Penelitian ini menggunakan kecepatan 5000 rpm selama 35 menit suhu 4°C. Pada penelitian El-Toukhy et al, (2013) produksi enzim fitase dari isolasi *Bacillus subtilis* MJA menggunakan sentrifugasi 5000 rpm selama 20 menit suhu 4°C. Wulandari (2011) produksi enzim fitase dari isolasi bakteri abu vulkanik gunung Merapi Jawa tengah menggunakan sentrifugasi 4000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Singh NK et al, (2013) produksi enzim fitase dari bakteri *Bacillus* DR6 menggunakan sentrifugasi 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Muthurama et al (2013) produksi fitase dari bakteri *Pseudomonas fluorescens* menggunakan sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Selvamoha et al (201) bahwa produksi enzim dari isolasi bakteri *Pseudomonas* sp. menggunakan sentrifugasi 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C.

b. Penentuan kadar protein metode Bradford

Supernatatan merupakan enzim kasar fitase yang dihasilkan *Burkholderia lata* dari variasi media produksi PPM (sumber fitat dan nitrogen) diukur kadar proteinnya untuk memastikan supernatant yang didapatkan adalah protein dan untuk mengetahui konsentrasi protein enzim yang terkandung di dalamnya. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode Bradford. Hal ini juga pada penelitian Indarwati, 2000 dan El-Toukhy et al. 2013 menggunakan metode Bradfor untuk pengukuran kadar protein.

Menurut Pelczar (2006) enzim dapat berupa protein murni/gabungan antara protein dengan gugusan-gugusan kimiawi lainnya. Sedangkan menurut Humang, (2013) enzim adalah protein yang mengkatalisis semua reaksi biokimia, yang merupakan zat yang dapat mempercepat laju reaksi kimia tanpa ikut bereaksi di dalamnya disebut dengan katalisator. Enzim dikenal untuk nama pertama kali sebagai protein oleh Summer pada tahun 1926 yang berhasil mengisolasi urease dari karang pedang (*jack bean*). Urease adalah enzim yang dapat mengurai urea menjadi CO_2 dan NH_3 . Beberapa tahun kemudian Nothrop dan Kunitz data mengisolasi pepsin, tripsi, dan kimotripsin. Selanjutnya makin banyak enzim yang telah didapatkan diisolasi dan telah dibuktikan bahwa enzim tersebut ialah suatu protein (Poedjiadi, 1994).

Metode Bradford merupakan salah satu cara mengetahui kadar protein enzim, dengan cara 0,1 mL supernatant dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan reagen Bradford kemudian didiamkan untuk terjadi reaksi selama ± 10 menit kemudian diukur absorbansinya. Absorbansi senyawa warna biru yang

terbentuk tersebut berbanding lurus dengan kadar protein. Data didapatkan berpatokan pada kurva standard (persamaan garis lurus) dengan regresi linear yang telah dibuat sebelumnya (Lampiran 12.a), dan memasukkan nilai absorbansi ke dalamnya, maka kadar protein enzim dapat diketahui.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan nilai kadar protein enzim tertinggi berturut-turut dilihat (gambar 4.3 dan lampiran 12.c) yaitu kedelai-pepton 46.5 mg/mL, kedelai-yeast 46.0 mg/mL, dan kedelai- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 48.5 mg/mL, padi – yeast Extract sebanyak 26.0 mg/mL, Jagung - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 25.5 mg/mL, padi – pepton sebanyak 23.0 mg/mL, padi - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 20.5 mg/mL, jagung – yeast extract sebanyak 20.5 mg/mL, Ca fitat - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 19.5 mg/mL, jagung – pepton sebanyak 16.5 mg/mL, Ca fitat – pepton sebanyak 15.5 mg/mL, dan Ca fitat - yeast extract sebanyak 12.0 mg/mL. maka dapat disimpulkan bahwa produksi fitase dari PPM sereal (kedelai, bekatul padi, jagung) memiliki kadar protein tinggi dibandingkan fitase dari PPM Ca-fitat yang memiliki nilai kadar protein rendah. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Indarwati (2000) bahwa produksi fitase dalam media PSM bekatul memberikan hasil yang lebih banyak dibandingkan dengan median PSM Ca-fitat. Media yang ditambahkan bekatul lebih mempunyai komposisi lebih lengkap yang tidak dimiliki oleh media yang ditambahkan Ca-fitat.

Selain itu dalam variasi media PPM juga memiliki kandungan dan komposisi yang lengkap dan dimanfaatkan oleh bakteri *Burkholderia lata* baik sumber nitrogen dan fosfat atau sumber nutrisi lainnya. Menurut Casida (1968) dalam

Indarwati (2000) media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme harus dapat memenuhi kebutuhan senyawa karbon, nitrogen, serta beberapa zat pertumbuhan seperti asam amino dan garam-garam mineral. Menurut Hafsa (2014) bahwa sumber nitrogen yang dimana mencakup asam amino, protein, atau senyawa bernitrogen lain yang terkandung pada pepton, *meat extract*, ammonium sulfat, atau trypton. Sedangkan sumber fosfat merupakan bagian dari beberapa protein, kofaktor atau ATP yang dapat dijumpai pada bahan yeast extract atau pepton. Namun hampir semua mikroorganisme dapat memanfaatkan fosfat organik yang ditambahkan langsung pada media seperti *potassium phosphate*, *sodium phosphate* dan begitupun kalsium fitat/natrium fitat. Begitupun juga pada fosfat yang diikat asam fitat dalam tanaman sereal seperti jagung, padi, dan kedelai.

c. Penentuan Aktivitas fitase

Fitase (EC.3.1.3.8) *myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase* merupakan kelompok enzim phosphatase yang mampu menghidrolisis asam fitat menjadi monophosphat organik, myo-inositol phosphate rendah (*lowe myo-inositol phosphate*), dan myo-inositol bebas. Kelompok fitase yang didapat dari isolasi bakteri adalah 3-*Phytase* (EC.3.1.3.8) dimana pada gugus fosfat pertama yang berikatan dengan 3-*Phytase* (EC.3.1.3.8) terdapat pada mikroorganisme (Kerovuo et al., 2000 dalam Sari, 2012). Fitase merupakan kelompok enzim yang mampu membebaskan fosfat dari fitat, yaitu bentuk penimbunan fosfat organik dalam. Enzim fitase dapat ditemukan pada beberapa mikroorganisme salah satunya adalah bakteri (Jorquera, et al. 2008 dalam Wulandari, 2011).

Menurut Sumner dan Somer (1947) mengatakan bahwa fermentasi untuk menghasilkan fitase digunakan fitat sebagai substrat. Fitat adalah bentuk fosfor organik yang terdiri dari Ca-Mg-fitat yang banyak terdapat dalam sereal. Biasanya tanaman sereal, biji-bijian atau kacang dijadikan sebagai pakan ternak, namun terdapat zat antinutrisi atau asam fitat sehingga sukar larut dan berdampak negatif pada pencernaan hewan monogastrik, maka dengan adanya penambahan fitase pada pakan pangan akan membantu menghidrolisis asam fitat menjadi 1 molekul inositol, 6 molekul fosfat organik, ion Ca^+ , Zn^+ , dan protein sehingga fosfat dan mineral yang terikat dapat dilepaskan dan dimanfaatkan oleh tubuh. Maka penelitian ini memproduksi fitase dari bakteri *Burkholderia lata* dari hasil fermentasi yang menggunakan substrat asam fitat

Aktivitas enzim merupakan kemampuan suatu enzim yang mengkatalisis reaksi enzimatik pada substrat yang sesuai. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, pH, konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat. Suatu enzim juga dapat bekerja secara khas (spesifik) terhadap suatu substrat tertentu, untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat harus ada kontak atau mempunyai sisi aktif untuk terjadinya enzim substrat. Maka penggunaan nama enzim sesuai dengan nama substranya, seperti enzim fitase yang dapat mengkatalisis substrat asam fitat. Sehingga pengujian suatu aktivitas enzim tergantung dari jenis induser yang ditambahkan didalamnya.

Pada penelitian ini didapatkan enzim kasar fitase yang berupa supernatant hasil fermentasi isolasi bakteri *Burkholderia lata* dari media produksi PPM, maka

untuk mengetahui kinerja enzim maka dilakukan penentuan aktivitas enzim fitase dengan mengukur kadar fosfat yang berlangsung selama enzimatis. Pengukuran dilakukan dengan cara enzim kasar fitase yang direaksikan dengan induser substrat asam fitat (Ca-fitat) lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Hal berdasarkan metode Shimizu, (1992), Singh et al, (2013), dan Muthuraman et, al. (2013). Selama inkubasi berlangsung maka terjadi reaksi enzimatis (enzim-substrat). Setelah inkubasi 30 menit, kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan trikloroasetat (TCA) 5%, lalu ditambahkan reagen warna molibdat-besi sulfat sehingga memberikan efek warna biru dengan keberadaan fosfat anorganik yang terbentuk, lalu diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 700 nm. Absorbansi dari senyawa kompleks tersebut (warna biru pekat) berbanding lurus dengan kadar fosfat. Maka untuk menentukan nilai aktivitas enzim fitase yaitu dengan cara memasukkan data absorbansi dalam persamaan regresi linear. Berpedoman pada kurva standar fosfat (Lampiran 11.a). maka dapat diartikan satu unit enzim fitase (1U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol (μM) fosfat anorganik (Pi) per menit pada kondisi pengukuran.

Hasil penelitian bahwa optimalisasi produksi enzim fitase bakteri endofit tanaman jagung (*Zea mays*) *Burkholderia latat* terhadap variasi media PPM (sumber fitat dan sumber nitrogen) dapat mempengaruhi aktivitas fitase, maka data yang dideskripsikan dilihat (gambar 4.3 dan lampiran 11.c) yang memiliki nilai aktivitas dari tertinggi yaitu kedelai-pepton 8.20 U/mL. kemudian berturut jagung - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7,20 U/mL kedelai – yeast extract 6.86 U/mL, kedelai – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.56

U/mL, padi – pepton 6.81 U/mL, padi – yeast 6.73 U/mL, jagung – yeast 6.70 U/mL, jagung – pepton 6.66 U/mL, padi - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.64 U/mL, Ca fitat - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.58 U/mL, kedelai - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.56 U/mL, Ca fitat - Yeast Extract 6.54 U/mL, dan ca fitat – pepton 6.54 U/mL. Jadi, optimalisasi media PPM (sumber fitat dan nitrogen) yang memiliki nilai aktivitas optimum dalam produksi fitase yaitu kedelai-pepton dengan aktivitas 8.20 U/mL. sedangkan menurut Ponpanich et al. (2003) dalam Kanpiengjai (2013) menggunakan dedak padi dan ekstrak tepung kedelai untuk memaksimalkan produksi fitase strain bakteri tanah PH01. Hasilnya memberikan penjelasan terbaik tentang hubungan antara asam fitat dan sumber nitrogen.

Pada produksi fitase dari substrat fitat sereal PPM yang memiliki nilai aktivitas fitase tertinggi yaitu kedelai, kemudian jagung dan dedak padi. Hal ini karena substrat kedelai memiliki kandungan asam fitat yang tinggi, selain itu juga mengandung protein yang tinggi dan kaya dengan nutrisi atau mineral lainnya sehingga nutrisi pertumbuhan *Burkholderia lata* dapat terpenuhi untuk produksi fitase yang maksimum. Menurut Lot et, al. (2000) dalam Kusumadjaja (2012) berdasarkan (Tabel 2.1) bahwa kadungan asam fitat yang terdapat tanaman pangan memang kedelai yang tinggi kandungan asam fitat sebesar 1,4% kemudian berturut jagung 0,9%, lalu padi 0,89%. Selain itu kedelai memiliki kandungan protein tinggi dibandingkan dengan jagung dan dedak padi menurut Bhatara (1981) dalam buku Poedjiadi (1994) sumber protein bahan makan dengan nilai kadar protein kedelai 30,2%, jagung kuning (butir) 7,9%, Beras giling 6,8%. Maka nutrisi yang terkandung

dalam sereal pada PPM dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nitrogen maupun sebagai sumber karbon, selain sebagai substrat untuk produksi fitase.

Setiap bakteri dapat menghasilkan lebih dari 1 jenis enzim atau beberapa enzim. Sehingga pada produksi fitase bakteri *Burkholderia lata* masih berupa ekstrak kasar, masih banyak senyawa pengotor didalamnya dan enzim lainnya. Hasil yang didapatkan bahwa nilai kadar protein dengan aktivitas fitase pada media produksi PPM tidak sejalan dengan banyak konsentrasi enzim protein terhadap aktivitasnya. Misalkan pada variasi media PPM Kedelai (gambar 4.2) bahwa kedelai-pepton memiliki nilai kadar protein rendah, namun memiliki nilai aktivitas tinggi, karena memiliki konsentrasi enzim fitase tinggi. Sedangkan jika dibandingkan media produksi PPM kedelai-yeast dan kedelai-(NH₄)₂SO₄ yang memiliki nilai kadar protein tinggi, tetapi aktivitasnya rendah hal ini dikarenakan konsentrasi enzim fitasenya rendah, begitupun dengan media PPM lainnya.

Pada penelitian ini juga disimpulkan bahwa aktivitas fitase yang dihasilkan media PPM pangan (kedelai, jagung dan, bekatul padi) memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan produksi fitase PPM Ca-Fitat. Maka pada penelitian ini produksi fitase dari tanaman pangan sereal sebagai alternatif substrat asam fitat yang harga murah dan mudah dijangkau, sedangkan jika produksi fitase dari substrat Ca-fitat selain harganya mahal dan susah dijangkau. Selain itu bahan pangan sereal digunakan juga sebagai komposisi pakan ternak hewan terutama ternak unggas.

Hasil penelitian yang sama menurut Indarwati (2000) bahwa aktivitas fitase yang dihasilkan pada media PSM dengan bekatul menunjukkan nilai yang lebih

tinggi dibandingkan dengan aktivitas fitase diproduksi pada media PSM dengan Ca-Fitat untuk kedua isola. Hal ini disebabkan fitat dalam bekatul mempunyai ikatan yang lebih lemah dibanding dengan fitat dalam Ca-fitat sehingga fitat dalam bekatul lebih mudah untuk dimanfaatkan sebagai substrat. Selain itu bekatul banyak mengandung vitamin B. Menurut Moat (1989), bahwa vitamin B merupakan komponen yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan sebagai bahan pembentuk koenzim. Koenzim dapat berikatan dengan beberapa enzim pada kurun waktu yang berlainan selama pertumbuhan bakteri dengan ikatan yang tidak begitu kuat. Koenzim akan diubah secara kimiawi oleh apoenzim dan dapat dianggap sebagai substrat khusus, tetapi kemudian akan diubah kembali pada bentuk semula pada akhir reaksi. Fenomena ini menjadikan koenzim berperan sebagai penghubung sebagai apoenzim yang menghubungkan beberapa reaksi kimia yang berbeda. Lay dan Hastowo (1992) menyatakan bahwa reaksi enzimatik pembentukan produk dari substrat tidak dapat berlangsung bila tidak terdapat koenzim meskipun ada apoenzimnya. Oleh karena koenzim disintesis dari vitamin, maka kekurangan vitamin yang nantinya dipakai sebagai koenzim akan menyebabkan berbagai enzim tidak berfungsi dan diproduksi dalam jumlah sedikit (Sri Indarwati 2000).

Beberapa penelitian memproduksi fitase dari tanaman pangan sereal dari berbagai jenis strain bakteri. Menurut T. Selvamohan et al (2012) bahwa Pengaruh sumber substrat pertanian produksi fitase dari *Pseudomonas* sp, hasil menunjukkan substrat bekatul ragi yang memiliki jumlah maksimum produksi fitase dengan aktivitas 0,891 U/mL dibandingkan dengan lainnya bekatul padi 0,551 U/mL,

bekatul jagung 0,639 U/mL, dan gandum 0,610 U/mL). Waktu optimum produksi fitase yaitu 72 jam. Amonium sulfat, Sukrosa dan suhu 37 °C yang diamati sebagai sumber nitrogen, karbon dan suhu inkubasi yang terbaik untuk produksi fitase lebih tinggi. Produksi fitase dari substrat pertanian memberikan banyak keuntungan terutama mengurangi biaya produksi.

Menurut Khianngam (2011) bahwa *Bacillus amyloliquefarciens* digunakan sebagai produksi enzim fitase dari berbagai sumber substrat pertanian bahwa Na-fitat adalah susbstrat terbaik untuk produksi aktivitas fitatse, tapi harganya mahal. Dedak padi, dedak gandum, kulit kacang, biji sisal, biji kacang tanah, biji sorgum, biji jagung, dan biji bunga matahari merupakan substrat alternatif yang dapat digunakan sebagai pakan ternak dengan biaya rendah. makanan sisal dan biji kacang tanah tidak ada aktivitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan dedak gandum ($21,833 \pm 0,837$ U/mL) dan biji sorgum ($21,185 \pm 0,000$ U/mL) menghasilkan aktivitas enzim yang lebih baik dari pada Na-fitat ($20,397 \pm 0,478$ U/mL). kemudian, penggunaan dedak padi ($18,256 \pm 0.000$ U/mL) sebagai substrat menunjukkan produksi fitase sama dengan aktivitas Na-phytase. Sedangkan biji jagung ($1.465 \pm 0,239$ U/mL) dan biji bunga matahari ($5,156 \pm 0,120$ U/mL) memiliki nilai aktivitas rendah dari Na-fitat.

Menurut Muthuraman et al, (2013) bahwa produksi fitase maksimum dari *Pseudomonas flurescens* menggunakan dedak gandum, yeast ekstrak, kalium dighidrogen fosfat sebagai sumber karbon, nitrogen dan fosfat pada pH 6, selama 3 hari dengan aktivitas enzim 32.94 U/mL pada kondisi yang optimum. Menurut Hussin

A. S. M. et al (2012) bahwa produksi fitase optimum menggunakan sumber fitat 13,6% bekatul padi dengan aktivitas 11,511 U/mL. Menurut Shumizu (1992) bahwa memproduksi fitase dari kedelai oleh *Bacillus suhtilis* (natto) N-7 dengan glutamate dan sukrosa sebagai sumber nitrogen dan carbon, kemudian hasil hidrolisis fitase dari pada asam fitat biji-bijian yang memiliki nilai aktivitas yaitu kedelai 7,84 $\mu\text{M/mL}$ dan dedak padi 2,77 $\mu\text{M/mL}$. Menurut Widowati (1998) produksi enzim fitase dari PSM bekatul dengan aktivitas fitase 0,5683 U/ml.

C. Implikasi Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian dapat dijadikan sebagai bahan informasi mengenai produksi enzim fitase dari bakteri endofit akar tanaman jagung (*Zea mays*) *Burkholderia lata* strain HF. Penggunaan enzim fitase ditambahkan pada pakan untuk meningkatkan kualitas nutrisi pakan, membantu pencernaan hewan monogastrik dan dapat mengatasi pencemaran lingkungan ternak. Mikroorganisme paling banyak digunakan dan dimanfaatkan dalam bidang industri baik di indsutri kesehatan dan industri ternak sehingga dapat mengembangkan kebutuhan masyarakat mengenai semakin peningkatnya produksi pakan hewan. Pada umumnya pakan ternak unggas terdiri dari tanaman sereal, biji-bijian dan kacang-kacang seperti kedelai, jagung dan padi. Hal ini selaras dalam QS. as-Sajadah/32: 27, Yasin/36: 33, dan Abasa/80: 24-32 bahwa Allah swt. menciptakan kemudian menumbuhkan tanaman biji-bijian untuk makan hewan ternak terutama ternak unggas dan untuk manusia sendiri dengan itu manusia sebagai makhluk yang berikan untuk

memperhatikan makanannya dan makanan yang dimakan oleh hewan ternak. Maka sebagai umat muslim sudah sepatutnya menjadi al-Qur'an dan al-Sunnah sebagai pedoman hidup dengan mengambil pelajaran di dalamnya karena kebenaran al-Qur'an sudah mutlak dan tidak ada keraguan didalamnya. Sebagai makhluk yang berakal maka manusia dianjurkan agar senantiasa menyikapi fenomena yang terjadi dengan ilmu seperti ilmu sains.



BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Fase pertumbuhan *Burkholderia lata* strain HF sebagai patokan produksi enzim fitase yaitu fase stasioner yaitu pada 62 jam dengan nilai OD₆₀₀ 2,060 log/sel.
2. Produksi fitase dari variasi *Phytase Production Medium* (PPM) sumber fitat dan sumber nitrogen oleh *Burkholderia lata* Strain HF bahwa aktivitas fitase media PPM (kedelai, padi dan jagung) memiliki nilai lebih tinggi dari pada produksi media PPM Ca-fitat yang lebih rendah nilai aktivitasnya. Sedangkan media produksi fitase (PPM) yang optimum adalah kedelai-pepton dengan kadar protein 46.5 mg/mL dan aktivitas fitase tertinggi 8.20 U/mL pada kondisi tertentu.

B. Saran

Adapun saran pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sebaiknya dilakukan optimalisasi produksi fitase *Burkholderia lata* strain HF pada variasi sumber karbon, pH, dan suhu.
2. Sebaiknya enzim kasar fitase *Burkholderia lata* strain HF uji stabilitas aktivitas fitase terhadap pengaruh pH buffer, suhu, konsentrasi substrat, dan ion logam.
3. Sebaiknya enzim kasar fitase (*Crude Enzyme*) diuji lanjut ke tahap permurnian fitase (*Pure Enzyme*).

KEPUSTAKAAN

al-Qur'anulkarim.

Akhdiya, A. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalik Termotabil*. *Buletin Plasma Nutfa* 9 No.2 (2003): h. 28-44.

Almatsier, Sunita. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Bandung: 2001.

Aly, Magda Mohamed. Sanna T., Saleh M. A., Saleh A. K. Production and Characterization of Phytase *Streptomyces luteogriseus* R10 Isolated from Decaying Wood Samples. Arabia: *International Journal of Agriculture and Biology*, 14 no.453 (17-3-2015): h. 515-522.

Arbianto, Purwo. *Biokimia Konsep-konsep Dasar*. Bandung: Kimia FMIPA ITB, 1993.

Awad, Ghada, E. A. et al. Optimization Of Phytase Production By *Penicillium Purpurogenum* GE1 Under Solid State Fermentation By Using Box-Behnken Design. King Saudi University: *Saudi Journal of Biological Sciences* 21 (2014): h. 81-88.

B. Sasirekha, Bedashree. and Champa KL. Optimization And Partial Purification Of Extracellular Phytase From *Pseudomonas aeruginosa* P6. European: *Palagia Research Library and European Journal of Experimental Biology* 2 no.1 (2012): h. 95-94.

Barbara J.E.S., and Christine J.C.B. what are Endophytes. In Microbial Root Endophyte (Eds: Thomas N.Sieber). Berlin: *Springer-Verlag*, (2006).

Beynon, R. J. dan Bond. *Proteolytic Enzymes*. Oxford: IRL Press, 1989.

Bintang, Maria. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga, 2010.

Blaabjerg K, Jørgensen H, Tauson AH, Poulsen HD. The presence of inositol phosphates in gastric pig digest is affected by time after feeding a nonfermented or fermented liquid wheat- and barley-based diet. *Journal Animal Science*. (2011) 89: 3153-3162.

Bradford MM. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Binding. *Anal. Biochem*. 72 (1976): 248-254.

- Brok, T.D. *Biology Of Microorganism*. Prentice Hall Inc, Englewood Cliff New Jersey, 1974.
- Chunshan, Q, Linghua Z, Yunji W and Yoshiyuki O. Production of phytase in slow phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience. and Bioeng.*, (2001) **92**:154-160.
- Cosgrove, D.J. Inositol Phosphate: Tahir Chemistry, Biochemistry and Physiology. Amsterdam: *Elsevier Scientific Publishing Company* (1980).
- El-Toukhy, Nabil M.K. Amany S. Youssef. and Mariam G. M. Mikhail. *Isolation, Purification And Characterization Of Phytase Form Bacillus Subtilis MJA*. Alexandria, New Borg El-Arab: *African Journal of Biotechnology* 12 no. 20 (15 may 2013): pp. 2957-2967.
- Fatichah, Nur Fiaty Yuni. Potensi Bakteri Endofit Sebagai Penghasil Enzim Kitinase, Protease, Dan Selulase Secara In Vitro. Malang: *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang*, 2011.
- Graminho Eduardo Rezende, Naoki Takaya, Akira Nakamura, Takayuki Hoshino. "Purification, biochemical characterization, and genetic cloning of the phytase produced by *Burkholderia* sp. strain a13". *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61 (2015):15-23.
- Greiner, R., and Konietzny, U. Phytase: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In: M.R. Bedford and G.G. Partridge (eds). *Enzymes in farm Animal Nutrition* 2nd Ed.USA: CABI Pub, 2011, 96-128.
- Hafsan. *Mikrobiologi Analitik*. Makassar: Alauddin University Press, 2014.
- Harvianti, Yuniar. Identifikasi Molekuler Bakteri Endofit Penghasil Fitase Asal Tanaman Jagung (*Zea Mays* L.) Berbasis Gen 16S rRNA. Makassar: *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains & Teknologi UIN Alauddin Makassar*. 2017.
- Humang, Reski Ihsan dan Delta. *Biokimia*. Makassar: Gunadarma Ilmu, 2013.
- Husseinkhani, Baharak., Giti Emtiaszi and Iraj Nahvi. Anaysis of Phytase Producing Bacteria (*Pseudomonas* sp.) from Poultry Faeces and Optimization of this Enzyme Production. Iran: *African Journal of Biotechnology* 8 no.17 (1 september 2009); pp 4229-4232.
- Hussin, A. S. M. et al. Optimization Of Cultivation Condition For The Production Of Phytase-Degrading Enzymes By Enterobacter Sakazakii ASUIA279 Isolated

- Form Malaysia Maize Root. Malaysia: *journal of Biotechnology and Biodiversity* 3 no. 2 (may 2012): pp. 1-10.
- Ibnu Katsir. *Terjemah dan Tafsir al-Qur'an jilid 1-8*. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'I, 2003.
- Indarwati, Sri. Isolasi dan Modifikasi Media Produksi Bakteri Penghasil Fitase. *Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian Institut Peternakan Bogor*, 2000.
- Iring, G.C.J. and D. J. Cosgrove. Inositol Phosphate Phosphatase of Microbiological Origin: the Inositol Pentaphosphate Products of *Aspergillus Ficus* Phytase. *Journal Bacterial* 112 no.1 (1972).
- Kanpiengjai, Apinun., Kridsada unban., Ronachai Prathanaphon., and Chartchai Khanongnuch. Optimal Medium and Conditions for Phytase Production by Thermophilic bacterium, *Anoxybacillus* sp. MHW14. *Food and Applied Bioscience Journal* (2013)1 No.3; 172-189.
- Kementrian Agama RI. Al-Qur'an dan Terjemah. Bandung: Cordoba, 2013.
- Kerovuo, J. A Novel Phytase from *Bacillus*: Characterization and Production of the Enzyme, pH. Finland: *Dissertation Univ. Helsinki*, 2000.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., and Apajalahti, J., *App. Environ. Microbiol* 64 (1998): hal. 2079-2085.
- Khairani, Gusti. Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Endofit Penghasil Hormon IAA (Indole Acetic Acid) Dari Akar Tanaman Jagung (*Zea mays* L.). *Skripsi*. Departemen Biologi fakultas Matematika dan ilmu pengetahuan alam. Universitas Sumatera Utara Medan, 2009.
- Khiangnam, Saowapar., Yupa Pootaeng, Apinya Sonloy, Juthamat Kajorn-aroonki, and Samboon Tanasupawai. Characterization and Comparison of Phytase Production by *Bacillus* and *Paenibacillus* strain from Thai Soils. Thailand: *Malaysian Journal of Microbiology* (2011).
- Kusumadaja, Aline Puspita. Penapisan, Karakteristik Fitase dan Analisis Homologi Gen Penyandi Fitase dari Bakteri Termofilik Kawah Ijeng Bayuwangi. Surabaya: *Disertasi*, Program Pascasarjana Jurusan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya, 200.

- Kumar, Manis. Sushma. Optimization of production media of Novel Phytase from *Aspergillus niger* Using Wheat Bran Waste. India: *International Journal of Sciences and Research (IJSR)* (2012): 3.358.
- Kumar, D. J. Mukesh., K. C. P. Rajamanikandan., K. S. Shamna., M. D. Balakumaran and P. T. Kalaichelvan., Extracellular Production Of Phytase By A Native *Bacillus Subtilis* Strain. India: *Sacholars Research Library: Annals of Biological Research* 3 no. 2 (2012) : 979-987.
- Lata, Suman., Smita Rastogi., Ashima Kapoor and Mohd. Imran. Optimization of culture conditional for the production of phytase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685. India: *international Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 4, Issue 2 (2013): pp 224-235.
- Lay B.W dan S. Hastowo. Mikrobiologi. Jakarta: Rajawali Press,1992.
- Lima-Filho, G.L., U.C Aroujo, G.M.T. Lima, L.C.N. Aleixo, S.R.F. Moremo, S.D. Santos-Filho, R.S. Freitas, M.V. Castro-Faria, and M. Bernardo-Filho. A New in Vitro Enzymatic Methode to Evaluate the Protective Effect of Phytic Acid Againts Copper Ions. Pakistan: *Journal Nutr*, 3 (2004).
- Marlida, Yetti. Gita Ciptaan. Dan Rina Delfita. Produksi Dan Karakterisasi Enzim Phytase Dari Mikroba Endofitik Dan Aplikasinya Untuk Meningkatkan Kualitas Pakan Unggas. Padang, Indonesia: *Depertement of animal nutrion, faculty of animal scince*, andalas University, artikel. 2010.
- Maenz, D. D. *Enzymatic Characteristic as They Relate to Their Use In Animal Feed*. In: *Enzyme in Animal Nutrition*. M. R, Bedfor and G. G. Partidge, Eds. CABI Pub, United Kingdom, 2005.
- Manzila Ifa, Tri Puji Priyatno, Muhammad Faris Fathin, Laksmi Ambarsari, Yadi Suryadi, I Made Samudera, dan Dwi Ningsih Susilowati. "Karakterisasi - 1,3-1,4-Glukanasebakteri Endofitik *Burkholderia cepacia* Isolate76 Asal Tanaman Padi[Characterization of -1,3-1,4-Glucanase from Rice Endophytic Bacterium *Burkholderia cepacia* E76]". *Berita Biologi*.14 no 2 (Agustus 2015): 143-153
- Martin, D. W. Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. Harper's Review of Biochemistry, 19th ed. Singapura: *Lange Medical Publication Maruzein asia*, 1983.
- Mittal, Arfana., Gulab Singh., Varsha Goyal., Anita Yadav., Kamal Rai Aneja., Sanjeev Kumar Guatam., and Neeraj Kumar Aggarwal. Isolation And Biochemical Characterization Of Acido-Thermophilic Extracelluelar Phytase Producing Bacterial Strain For Potential Application In Poultry Feed. India:

Original article: Jundishapur Journal of microbiology, 4 no. 4 (2011): h. 273-282.

Moat A.G. *Microbial Psychology*. New York: John and Sons Inc, 1979.

Muchtadi, D. *Kajian Gizi Produk Olahan Kedelai Dalam Widowati, Sri et al.: Karakteristik Fitase Dari Bacillus Coagulans*. Bogor: *Prosiding Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan*, 1998.

Muthuraman, Meenakshi Sundaram and Avinash Tungala, K. Anantha Narayanan. Isolation Of Phytase Producing Bacteria From Poultry Faeces And Optimization Of Culuture Conditions For Enhanced Phytase Production. *Academis Science: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, Issue 2 (2013).

Ngili, Dr. Yohanis. *Protein dan Enzim*. Bandung: Rekayasa Sains, 2013.

Nurchahyo H. *Diktat Bioteknologi*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta, 2011.

Nurhikma. *Isolasi Dan Skrining Bakteri Endofit Penghasil Fitase Dari Tanaman Jagung (Zea mays)*. Makassar: *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains & Teknologi UIN Alauddin Makassar*. 2017.

Nurjannah R. *Aktivitas Fitase Termotabil Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Sulili Kabupaten Pinrang Sulawesi*. Makassar: *Skripsi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar*, 2011.

Paliwal, R.L. *Tropical Maize Morphology*. In: *tropical maize: improvement and production*. Rom: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2000): p 13-20.

Pallauf J, Rimbach G. *Nutritional Arch Tierernahr*, 1997; 50: 301-19. PMID:9345595

Pandey, Ashok., George Szakecs., Carlos R. Soccol., Jose A. Rodeiguez-Leon., and Vanete T. Socco. Production, purification and properties of microbial phytases, significance of phytic acid and phytase.. *Journal Biosource Technology* 77 Elsevier , 2001: 203-214.

Poedjiadi, Prof. D. Anna dan Titin Supriyanti. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press, 2006.

- Pleszczar, Michael J., E.C.S Chan, dan Ratna Siri Hadioetomo. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press), 2006.
- Pratiwi, Brasti Eka. Isolasi Dan Skrining Fitokimia Bakteri Endofit Dari Daun Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri. Jakarta: *Skripsi fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi*, 2015.
- Pratiwi, Syvilia T. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga, 2008.
- Purwandani, Lufi febi. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Fitase dari Sumber Air Panas Rimbp Panti Pasaman. *Skripsi*. Padang: Fakultas Peternakan Universitas Andalas, 2010.
- R. Thyagarajan et al. Partial Purification Of Phytase From *Hypocrea Lixii* SURT01, A Poltry Isolate. India: *Research Article Biotechnology, International Journal of Pharma and Bio Sciences* 5 no. 4 (2014): h. 680-687.
- Rafan Abd-Alhadi et al. Production Of Extracellular Phytase From *Bacillus Subtilis* Isolated From Syarian Soil. India: *Sphinx Knowledge House: International Journal of Pharmatech Research* 8, no.1 (2015): pp 154-159.
- Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res.* 1982;28: 1-92. PMID: 6299067
- Rebeula, M., T. Selvamohan., and v. Ramadas. Optimazation of Phytase Production by *Pseudomonas* sp. Isolated from Poultry Faces. India: *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, (2012) 2 (3): pp-1326-1330.
- Richarson T, dan Hyslop Dg. *Enzyme*. Didalam: Fenema OR (ed). Food Cehmistry. New York: Marcel Dekker Inc, 1985.
- Risnawati. Optimalisasi substrat dan waktu inkubasi bakteri simbion makroalga *euchema* sp Penghasil enzim L-asparaginase. Makassar: *skripsi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar*, 2015.
- Rombola TH, Pedrinho EAN, Lemos EGM, Goncalves AM, Santos LFJ, Jr JMP. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. *BMC Research Notes*. 7 (2014): 221
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacteria endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*. 278 (2007): 1-9.

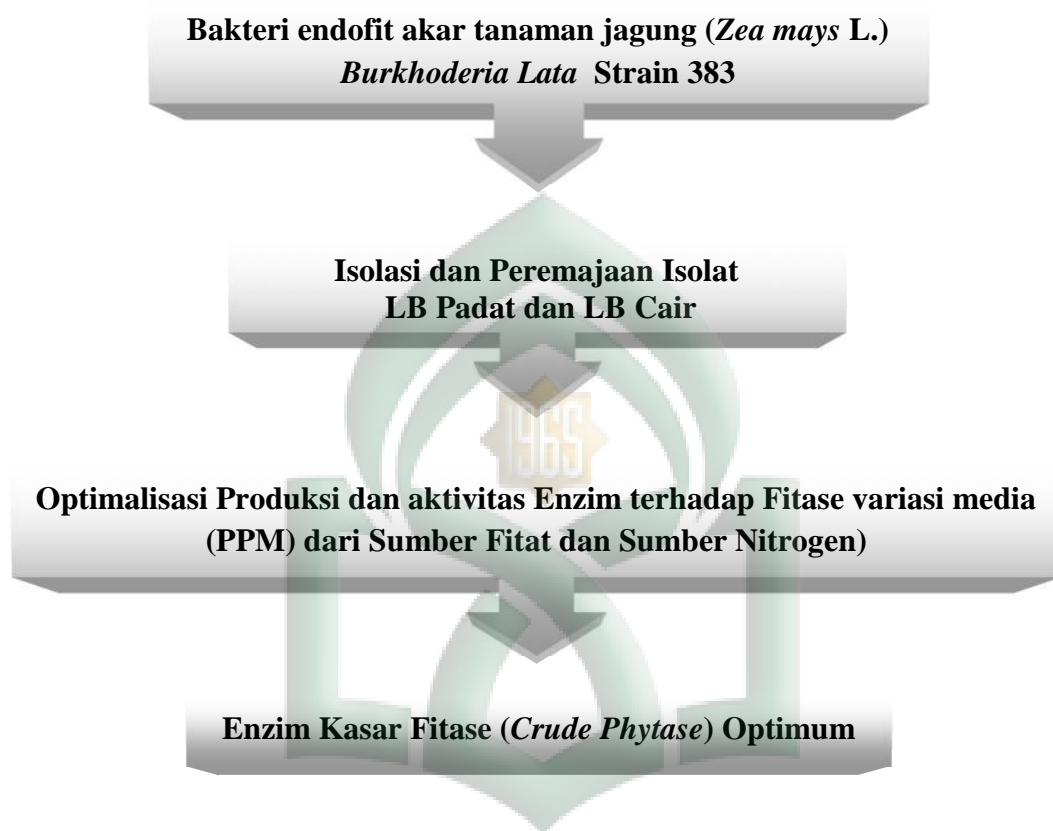
- Sajidan, A. Ratriyanto dan A.M.P. Nuhriawangsa. Pengaruh Bakteri Penghasil Fitase pada Pakan Campuran Wheat Pollard terhadap Performa Ayam Broiler. Buletin Peternakan. Yogyakarta: *Fakultas Peternakan UGM* 28 No.3 (2004): 105-114.
- Sandhya, A., A. Sridevi., P. Suvarnalatha Devi., and G. Narasimha. Production and Optimization Of Phytase By *Aspergillus niger*. India: *Scholar Research Library, Der Pharmacia Lettre* 7 no. 12 (2015): 148-153.
- Santoso, Slamet dan Sajida. Keberadaan Bakteri Penghasil Fitase untuk Perbaikan Kesuburan Tanah Versitol pada Berbagai Sistem Budidaya Tanaman Di Kecamatan Gondangrejo Kabupaten Karangayar. Indonesia: *Journal Bioedukasi* 6 No.1 (2013): h. 1-11.
- Sari, Meisji Liana dan F. Gukri N Ginting. Pengaruh Penambahan Enzim Fitase pada Rasum Terhadap Berat Relatif Organ Pencernaan Ayam Broiler. Palembang: Universitas Sriwijaya, *Jurnal Agripet* 12 No.2 (2013): h. 37-41.
- Sari, Evy Novita., Sajidan., dan Sugiyarto. Identifikasi Penghasil Fitase dan Karakteristik Fitase dari Kawah Sikidang Dieng. *El-Vivo: Jurnal Biosain Pasca UNS* 1 no.1 (2012).
- Satiawihardjaja B, Suhartono MT, Kusnidar A. *Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap aktivitasnya dan daya tahan panas protease dari Bacillus pumilus Y1*. *Bul Teknol Industri Pangan* 7 (1997): 47-56.
- Schwimmer S. *Source Book of Food Enzymology*. Connecticut: AV1,1981.
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati, 2002.
- Shimizu, Mikio. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-7: Sakura/japan: *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* (1992) 56. 8; 1266-1269
- Shin, S., N.C. Ha., B.C. Oh, T.K. Oh., and B.H. Oh. Enzyme Mechanisme and catalytic Property of Propeller Phytase. *J. Structure*. 9, (2001).
- Singh N. K., Dharmendra Kumar Johsi., and Raj Kishor Guptar. Isolation Of Phytase Producing Bacteria And Optimization Of Phytase Production Parameters. Summer: *Jundishapur Journal of Microbiology* 6 no. 5 (2013.):6419.
- Smith, M.E., C.A. Miles, and J. van Beem.1995. *Genetic Improvement Of Maize For Nitrogen Use Efficiency*. In *Maize research for stress environment*. p. 39-43.

- Sreedevi Sarsan. A review on role of microbial phytases in agriculture. *Online Int. Interdiscipl. Res. J.*, 2013. 3(5): 9199.
- Sreedevi, S., Reddy, B.N.. Identification of phytase producing bacteria C43 isolated from cattle shed soil samples of Hydrabad, A.P. *Helix*, (2013) 1: 238242
- Strobel G. dan B. Daisy. *Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Microbiol 67 (2003): 461-50.
- Suhartono, M. T. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Depdikbud Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Bioteknologi IPB, 1989.
- Sumner J.B and G.F Somers. *Chemistry and Methods of Enzymes*. New York: Academic Press Inc Publisers, 1947).
- Suriawiria, Prof. Drs. Unus. *Mikrobiologi Air*. Bandung: P. T. Alumni, 2008.
- Susanan, I.W. R., B. Tangenjaya., dan S. Hastiono. Seleksi Kapang Penghasil Enzim fitase. Bogor: *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* Vol.5 No.1: 2000.
- Susilowati, D.N.R. Saraswati E., Yuniarta. Isolasi dan seleksi mikroba diazotrof endofitik dan penghasil zat pemacu tumbuh tanaman padi dan jagung. *Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian* (2003): Hlm 128-143.
- Tan, R.X. and W.X Zou. *Endophytes: a rich source of functional metabolites* Nat Prod. Rep 18: 448-459, 2001.
- Tarabily, K.A.H., Nassar, K. Sivasithamparam. *Promotion of Plant Growth By An Auxin-Producing Isolat of the Yeast Williopsis Saturnus Endophytic In Maize Roots*. The Sixth U.A E University Research Conference (2003): Hlm: 60-69.
- Tenner, F.W. *Bacteriology a text book of mikroorganism 3th ed.* London: John Wiley and Sons Inc, 1988.
- Tran, T.T. Thermostable Phytase From a Bacillus sp. Heterologous Production, Mutatio, Charavterization and assay Development. *Docotral Tehsis*. Deparment of Biotechnology Lund University, 2010.
- Tringan, J. *Pengantar Mikrobiologi*. Jakarta: Proyek Pengembangan Lembaga Tenaga Pendidikan, 1988.

- Unno, Y., Okubo, K., Wasaki, J., Shinano, T., and Osaki, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environ. Microbiol.*, 7, No. 396 ((2005): 40.
- Vandamme Peter dan Tom Coenye. *Burkholderia* Molecular Microbiology and Genomics. Horison: British Library, 2006.
- Vanlaere, Elke, Adam Baldwin, Dirk Gevers, Deborah Henry, Evie De Brandt, John J. LiPuma, Eshwar Mahenthiralingam, David P. Speert, Chris Dowson and Peter Vandamme. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* No. 59 (2009): 102–111.
- Vieille, C. and G.J. Zeikus. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbio and Molecular Bio* Vol.64 (2001): 1-43.
- Vihinen, M. Manstala P. *Microbial Amylolytic Enzymes*. Biochem Mol Bio. Vol. 24 No. 329-418, 1989.
- Wahyuni, S.H.S. Biokonversi Dedak Padi Oleh Kapang *Aspergillus ficuum* sebagai Upaya Menurunkan Kadar Fitat dan Pengaruhnya Terhadap Kinerja Ayam Petelur. *Tesis*. Bogor: Program Pascasarjana IPB, 1938.
- Waluyo, L. *Mikrobiologi Lingkungan*. Malang: UMM Press, journal of Agriculture and Biological Sciences, 1 (3): 241-245, 2009.
- Wang X, Uphatam S, Panbangred W, Isarangkul D, Summpunn P, Wiyakrutta S, Meevoostisomd V. *Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from Klebsiella pneumonia subsp, Pneumoniae XY-5*, *Sci. Asia* 30: 383-390, 2004.
- Wardhani, Nuraini Kusuma. Kualitas Susu Jagung yang Difermentasi Menggunakan Bakteri Asalm Laktat (BAL) Indigenous Limbah Pembuatan Dangeke. Makassar: *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Aluddin Makassar*, 2015.
- Wilardjo, F. G. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia, 1986.
- Wodzinski, R.J, and A.H.J dan Ullah. *Phytase*. *Adv. Appl. Microbiol.* Vol.42 (1996): 263-302.

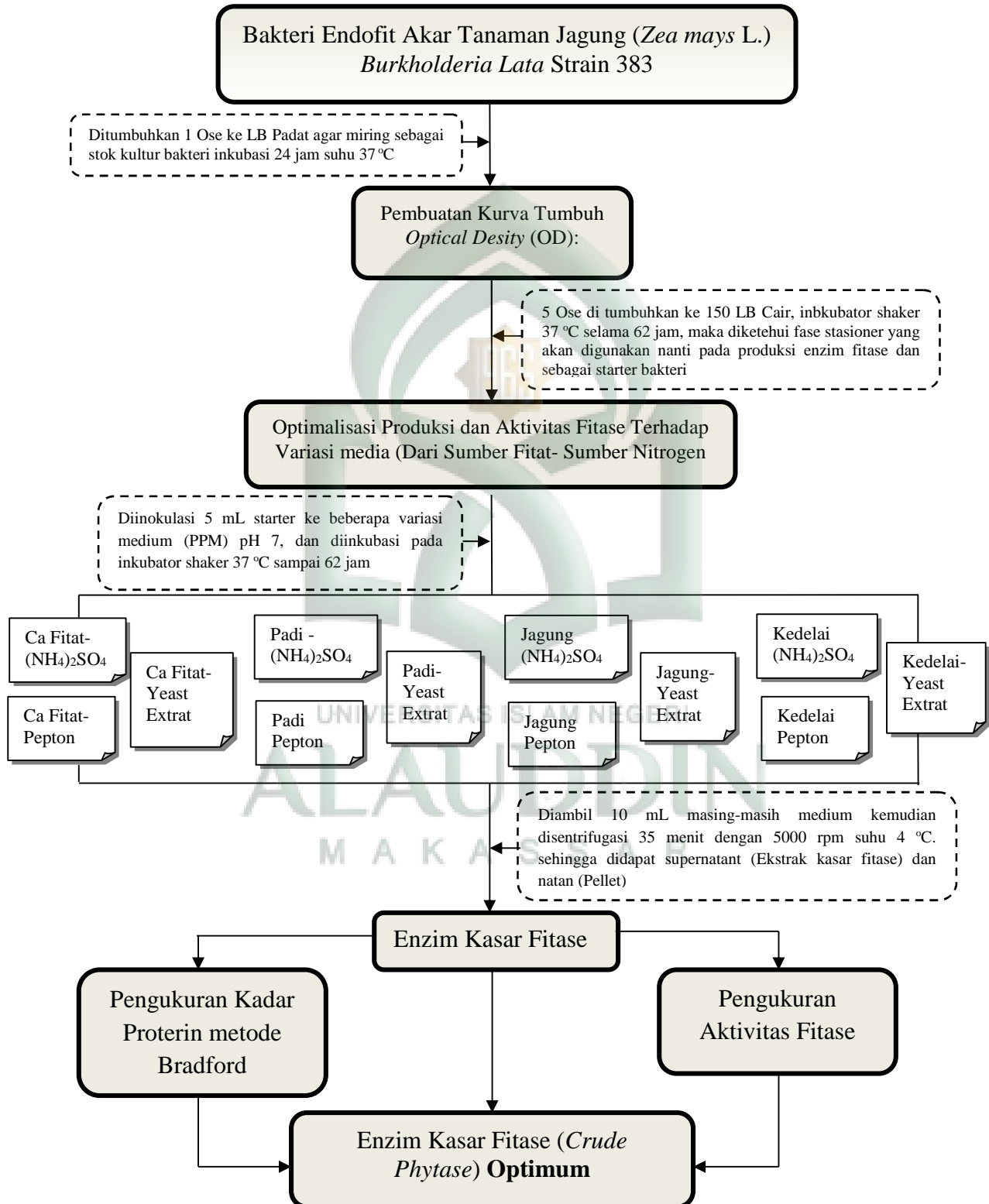
- Wulandari, Riski., Silvera Devi, dan Andi Dahliaty. Optimalisasi pH Produksi Selulase dari Bakteri Endofitik *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC53, *Pseudomonas stutzeri* LBKURCC54, dan *Actinobacter antratus* LBKURCC60. Riau: *urnal bidanb kimia biokimia Jurusan kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA)*, Vol.2. No.1 (2015).
- Wulandari, Rita, Sajidan, dan Suranto. Analisis Gen 16s rRNA pada Bakteri Penghasil Enzim Fitase. Surakart: *Sikripsi Program Pasca Sarjana Universitas Sebelah Maret Surakarta*, 2011.
- Wyss, M, Burgger R., Kronenberger A. RemyR., Fimbel R., *Biochemical Characterization of Fungal Phytases (Myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties*. Appl Enviro Microbiol Vol. 65, 1999.
- Yanuartono, Alfarisa N. dan Soedarmanto I. Fitat dan Fitase: dampak pada hewan ternak. Yogyakarta: Artikel Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada (*Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*), 26 (3): 59-78.
- Yulianti E dkk. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thitonia diversifolia*) sebagai bahan insektisida Botani untuk Pengendalian Hama Tungau Eriophyidae. *Alchemy* 2 No. 1 (2010): h. 132.
- Yunus, A. Nurhriawangsa, A.M.P., Swastike W. Pemanfaatan Bakteri Penghasil Fitase Asli Indonesia Untuk Meningkatkan Ketersediaan Sumber Phospat Organik pada Pakan Ayam Broiler Ramah Lingkungan. Yogyakarta: *Laporan Penelitian*, 2004.
- Zyla, K. Mould Phytases and Their Application in the Food Industry. *World Jurnal Microbiol. Biotechnol* 8 (1992) : 46-472.

Lampiran 1.: Skema Penelitian



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
M A K A S S A R

Lampiran 2.: Skema Alir Penelitian



Lampiran 3: Komposisi dan Cara Pembuatan Media

a. *Luria Bertani (LB)* padat

No.	Bahan	Jumlah
1.	Bacto Agar	20 gram
2.	Peptone	10 gram
3.	NaCl	10 gram
4.	Yeast Ekstrak	5 gram
5.	Akuades	1000 ml

b. *Luria Bertani (LB)* cair

No.	Bahan	Jumlah
1.	Peptone	10 gram
2.	NaCl	10 gram
3.	Yeast Ekstrak	5 gram
4.	Akuades	1000 ml

c. PPM (*Phytase Production Medium*)

No.	Bahan	Jumlah
1.	Ca-Fitat / bekatul padi / dedak jagug / kedelai	0,5 gram
2.	(NH ₄) ₂ SO ₄ / Yeast ekstrat / Pepton	0,5 gram
3.	Glukosa	1,5 gram
4.	NaCl	0,01 gram
5.	KCl	0,05 gram
6.	FeSO ₄	0,001 gram
7.	MgSO ₄	0,01 gram
8.	CaCl ₂	0,01gram
9.	MnSO ₄	0,001 gram
10.	Akuades	100 mL

Semua bahan media dilarutkan dengan aquadest dalam gelas beker kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga larut, lalu pH 7. Media tersebut disterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C menggunakan autoklaf.

Lampiran 4.: Perhitungan Pembuatan Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7

Diketahui Mr = 121,14 gr/mol

M = 0,1 M

V = 500 mL

Ditanyakan: Massa = gram?

Penyelesaian:

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{Massa}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V}$$

$$\text{Massa} = \frac{M \cdot \text{Mr} \cdot V}{1000} = \frac{0,1 \cdot 121,14 \cdot 500}{1000} = \frac{6057}{1000} = 6,057 \text{ gram}$$

Jadi, 6, 057 gram timbang Tris dilarutkan ke 400 mL aquadest steril, kemudian diukur pH. Untuk mendapat pH netral 7, maka pH diatur dengan ditambahkan HCl 6 M sebagai asam dan NaOH sebagai basa, volume Buffer mencapai 500 mL.

Lampiran 5.: Perhitungan Pembuatan Substrat Aktivitas Fitase 100 mL Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7 mengandung 2 mM Ca-Fitat dan 2 mM CaCl₂.

Diketahui: V Tris-HCl 0,1 M pH7 = 100 mL

$$M \text{ Ca-Fitat} = 2 \text{ mM (0,002 M)}$$

$$M \text{ CaCl}_2 = 2 \text{ mM (0,002 M)}$$

Ditanyakan: a. Massa Ca-Fitat =?

b. Massa CaCl₂ =?

Penyelesaian:

a. Mencari Mr Ca-Fitat (Ca₆C₆H₆O₂₄P₆)

$$Mr = (Ar \text{ Ca} \times 6) + (Ar \text{ C} \times 6) + (Ar \text{ H} \times 6) + (Ar \text{ O} \times 24) + (Ar \text{ P} \times 6)$$

$$Mr = (40,08 \times 6) + (12,01 \times 6) + (1,01 \times 6) + (16,00 \times 24) + (30,97 \times 6)$$

$$Mr = 240,48 + 72,06 + 6,06 + 384 + 185,82 = 888,42 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Massa} = \frac{M \cdot Mr \cdot V}{1000} = \frac{0,002 \cdot 888,42 \cdot 100}{1000} = \frac{177,684}{1000} = 0,178 \text{ gram}$$

b. Mencari Mr CaCl₂

$$Mr = (Ar \text{ Ca} \times 1) + (Ar \text{ Cl} \times 2)$$

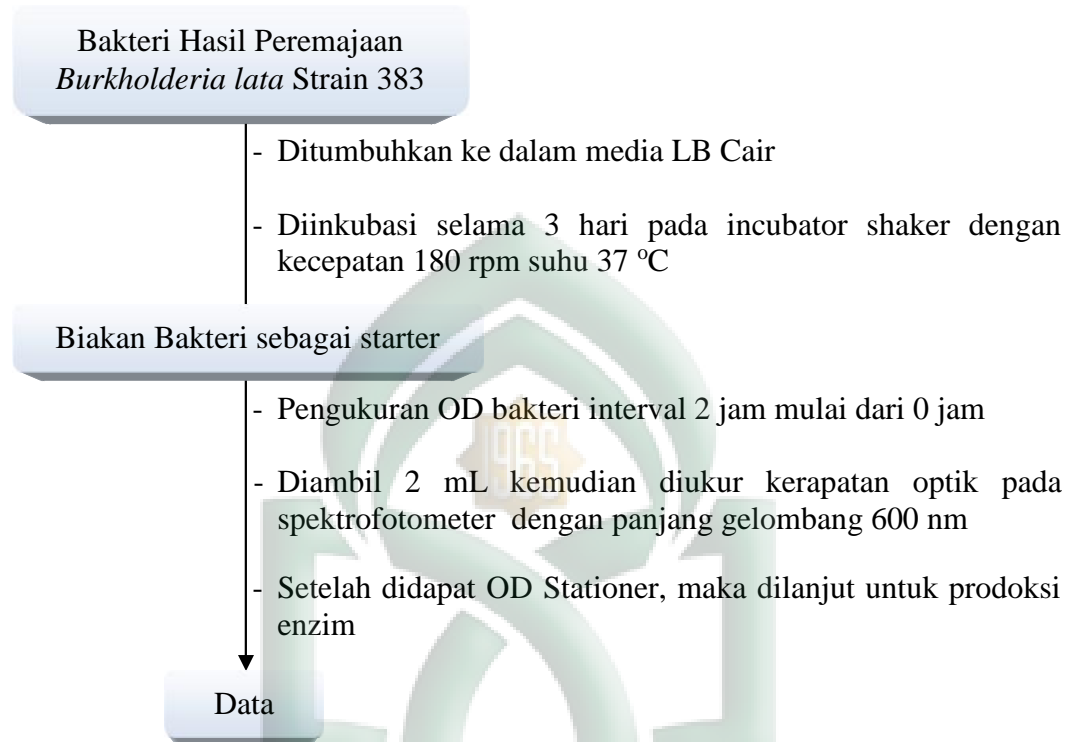
$$Mr = (40,08 \times 1) + (35,453 \times 2)$$

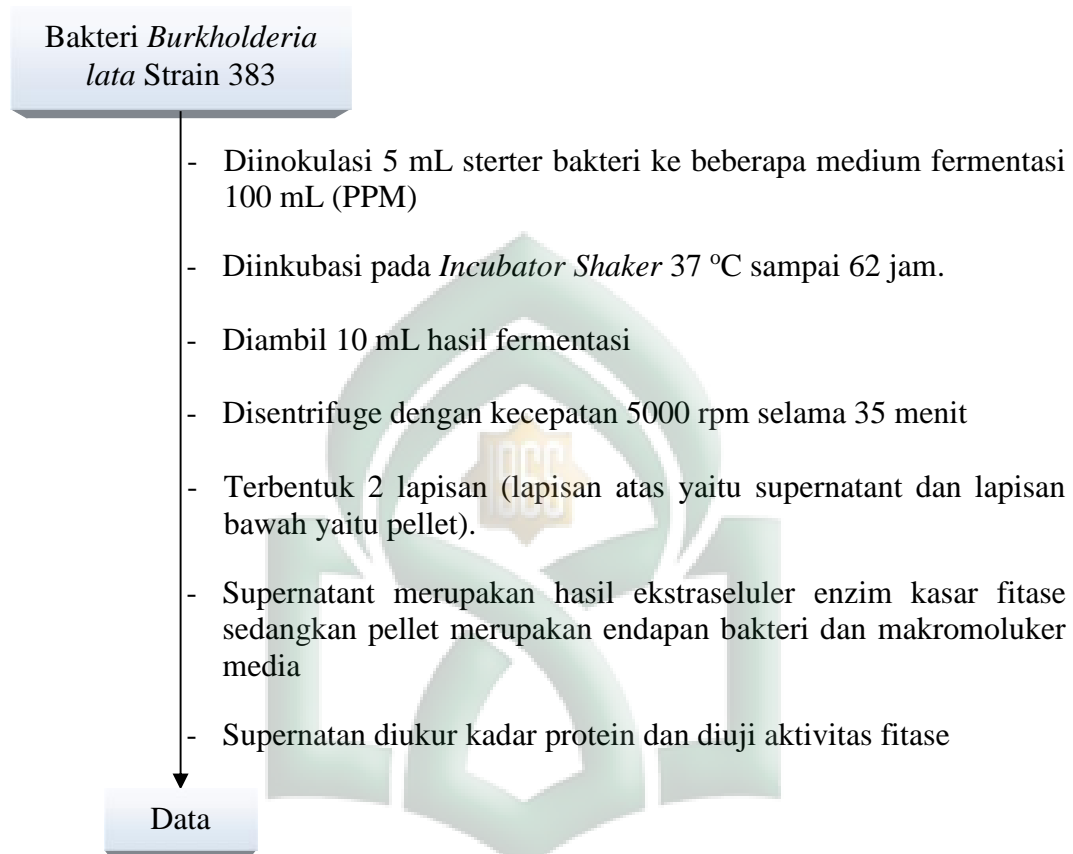
$$Mr = 40,08 + 70,906 = 110,986 \text{ gr/mol}$$

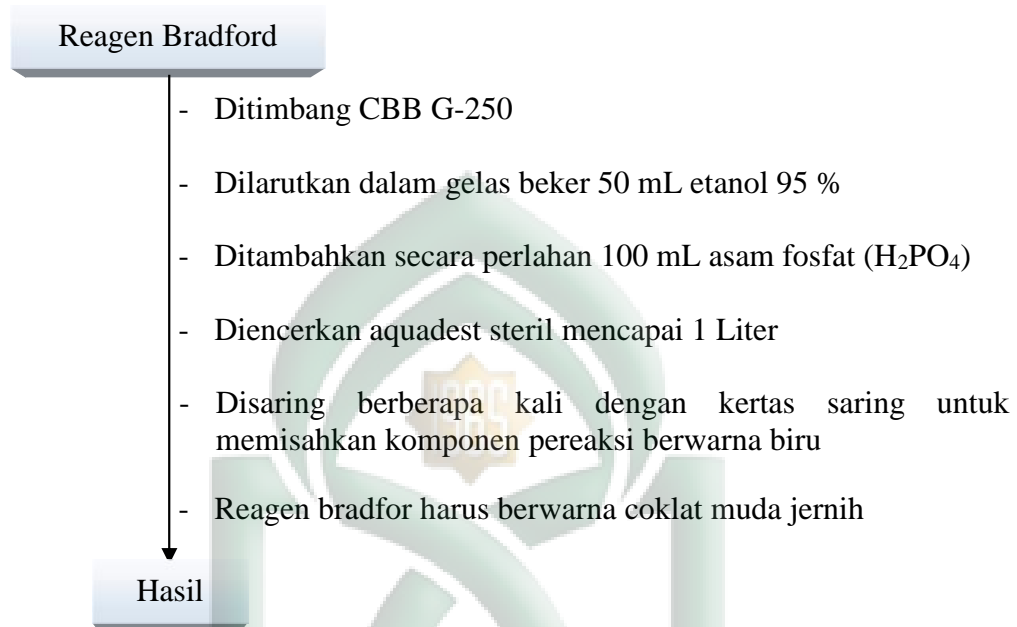
$$\text{Massa} = \frac{M \cdot Mr \cdot V}{1000} = \frac{0,002 \cdot 110,986 \cdot 100}{1000} = \frac{22,20}{1000} = 0,022 \text{ gram}$$

Jadi, ditimbang 0,178 gram Ca-Fitat dan 0,022 gram CaCl₂ , kemudian dilarutkan dalam gelas beker 100 mL Tris-HCl 0,1 M pH 7.

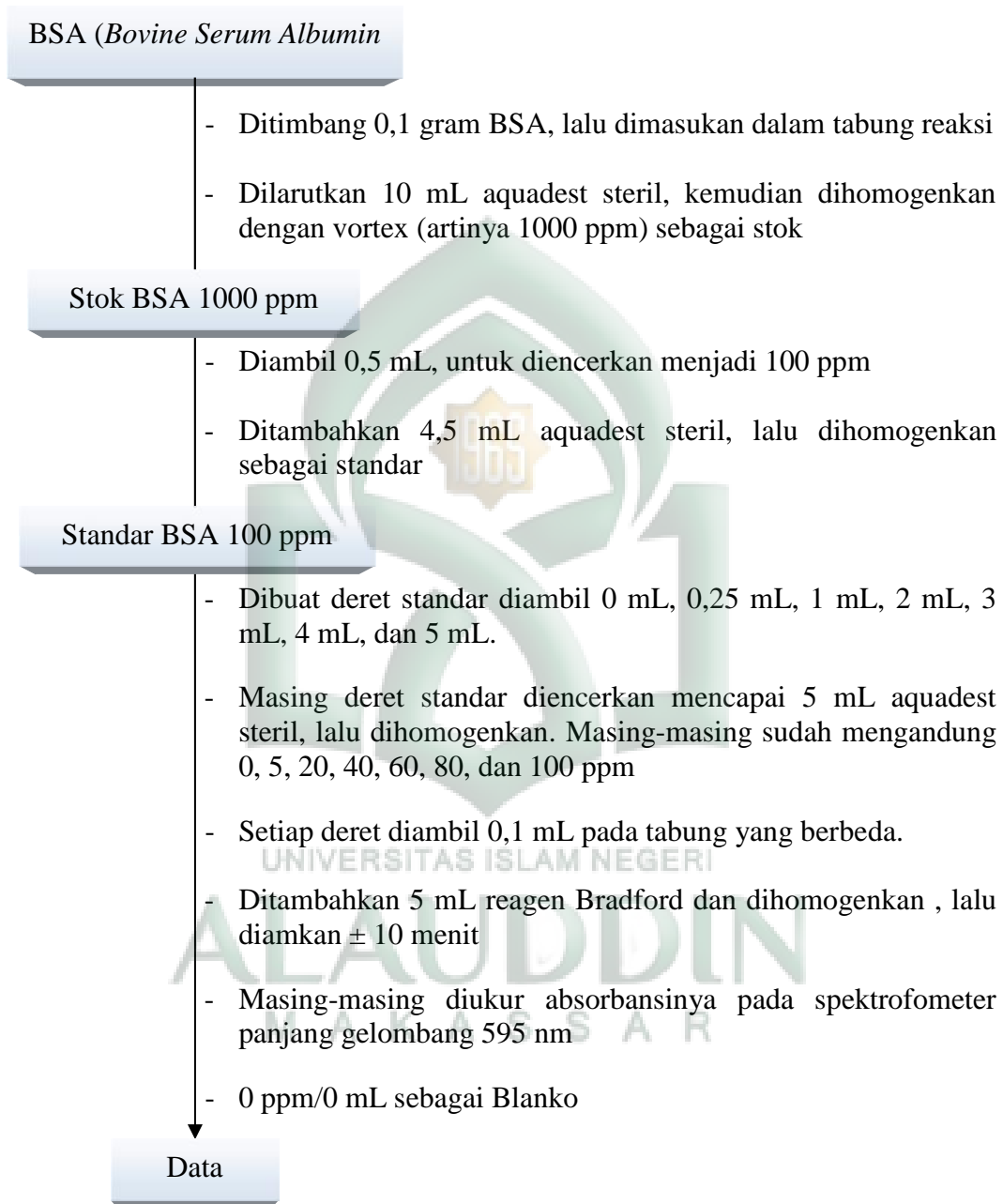
Lampiran 6.: Skema Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Burkholderia lata* Strain-HF



Lampiran 7.: Skema Produksi Enzim Fitase

Lampiran 8.: Skema Penngukuran Kadar Portein metode Bradford**1. Pembuatan Reagen**

2. Pengukuran Kurva Standar Protein BSA



3. Pengukuran Kadar Protein Enzim Kasar Fitase

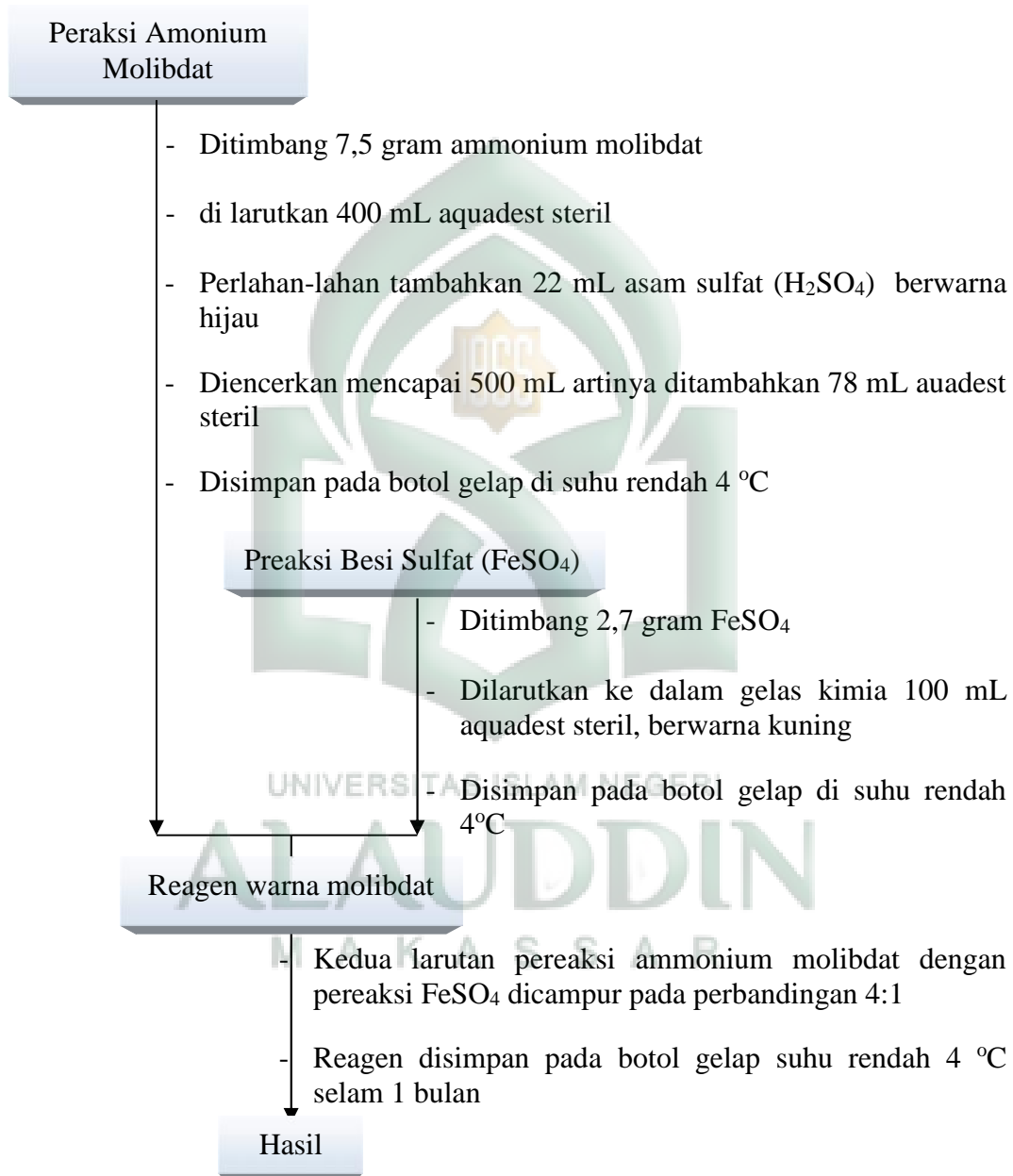
Ekstrak Kasar Enzim Fitase

- Diambil 0,1 ml enzim disimpan pada tabung reaksi atau botol vial
- Ditambahkan 5 ml reagen Bradford dan dihomogenkan , lalu diamkan ± 10 menit
- Diukur absorbansinya pada spektrofometer panjang gelombang 595 nm
- Blanko dibuat 0 ppm/0 ml sama seperti pengukuran kurva standar
- Nilai yang didapat, maka untuk diketahui kadar protein enzim. Dihitung dengan persamaan regresi linear Standar Protein BSA

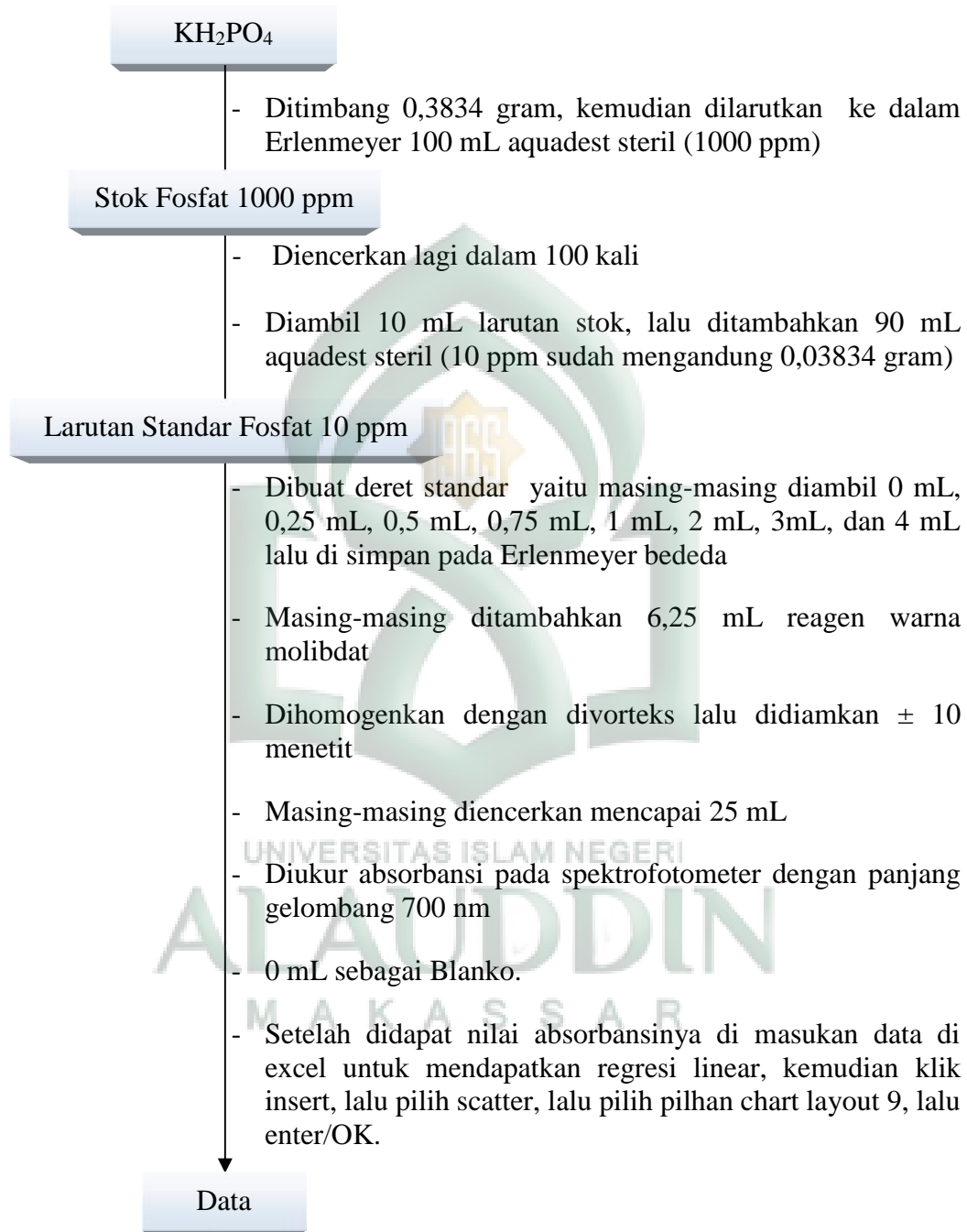
Data

Lampiran 9.: Skema Uji Aktivitas Fitase

1. Pembuatan Reagen Warna Molibdat



2. Pengukuran Kurva standar Fosfat



3. Pengukuran aktivitas Fitase

Ekstrak Kasar Enzim Fitase

- Diambil 0,15 ml enzim disimpan pada tabung reaksi/botol vial
- Ditambah 0,6 ml Buffer Tris-hcl 0,1 M yang mengandung 2 mm Ca-fitat dan 2 mm CaCl_2 ph 7
- Dihomogengkan dengan divorteks, lalu diinkubasi pada inkubator suhu 37 °c selama 30 menit
- Ditambahkan 0,75 Trikloroasetat (TCA) 5%
- Ditambahkan 1,5 reagen warna molibdat, lalu dihomogenkan dengan divorteks
- Diukur absorbansi pada spektrofotometer panjang gelombang 700 nm
- Blanko dibuat sama seperti pengukuran kurva standar yaitu 0 ml
- Nilai yang didapat, maka untuk diketahui nilai aktivitas fitse. Dihitung dengan persamaan regresi linear yang didapat kurva stadar.

Data

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
ALAUDDIN
MAKASSAR

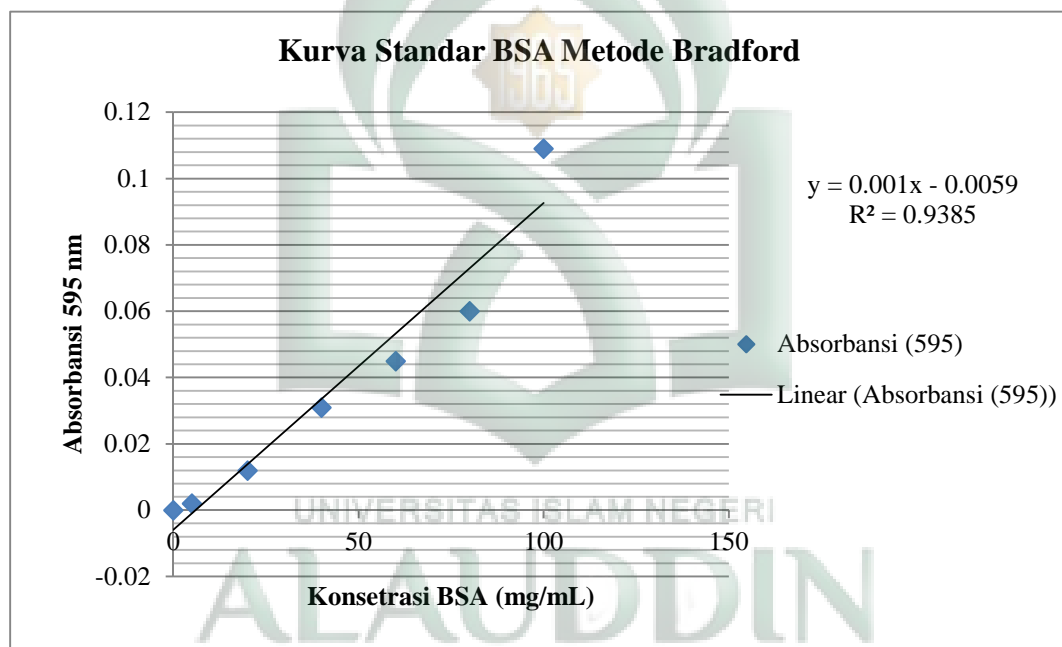
Lampiran 10.: Data Kurva Pertumbuhan Bakteri *Burkholderia lata*

Waktu (Jam)	Absorbansi 600 nm (Log/Sel)	Waktu (Jam)	Absorbansi 600 nm (Log/Sel)
0	0,031	40	1,79
2	0,114	42	1,832
4	0,488	44	1,846
6	0,759	46	1,882
8	0,796	48	1,908
10	0,894	50	1,944
12	0,998	52	1,946
14	1,063	54	1,975
16	1,145	56	1,981
18	1,219	58	2,024
22	1,329	60	2,055
24	1,443	62	2,060
26	1,467	64	2,051
28	1,482	66	2,047
30	1,499	68	2,038
32	1,505	70	2,029
34	1,686	72	2,007
36	1,714	74	1,756
38	1,735	76	1,702

Lampiran 11.: Data Penentuan Kadar Protein

a. Pengukuran kurva standar protein metode Bradford

Konsentrasi BSA (ppm)	Absorbansi (595)
0	0.000
5	0.002
20	0.012
40	0.031
60	0.045
80	0.060
100	0.109



b. Absorbansi protein fitase

No	Variasi Media Produksi	Absorbansi 595 nm	
		Ulangan 1	Ulangan 2
1	Ca Fitat - (NH ₄) ₂ SO ₄	0,013	0,016
2	Ca Fltat - Yeast Exstract	0,007	0,007
3	Ca Fitat - Pepton	0,010	0,011
4	Padi - (NH ₄) ₂ SO ₄	0,013	0,018
5	Padi – Yeast	0,022	0,020
6	Padi – Pepton	0,019	0,017
7	Jagung - (NH ₄) ₂ SO ₄	0,020	0,021
8	Jagung – Yeast	0,015	0,016
9	Jagung - Pepton	0,012	0,011
10	Kedelai - (NH ₄) ₂ SO ₄	0,045	0,042
11	Kedelai – Yeast	0,040	0,042
12	Kedelai - Pepton	0,042	0,041

Pengukuran kadar protein fitas dengan cara nilai absorbansi dimasukkan dalam regresi linear dari kurva standar protein albumin (BSA):

$$y = 0.001x - 0.005$$

$$y = ax - b$$

$$x = \left(\frac{y + b}{a} \right)$$

$$= \frac{0.041 + 0.005}{0.001} = \frac{0.046}{0.001}$$

$$= 46 \text{ mg/mL}$$

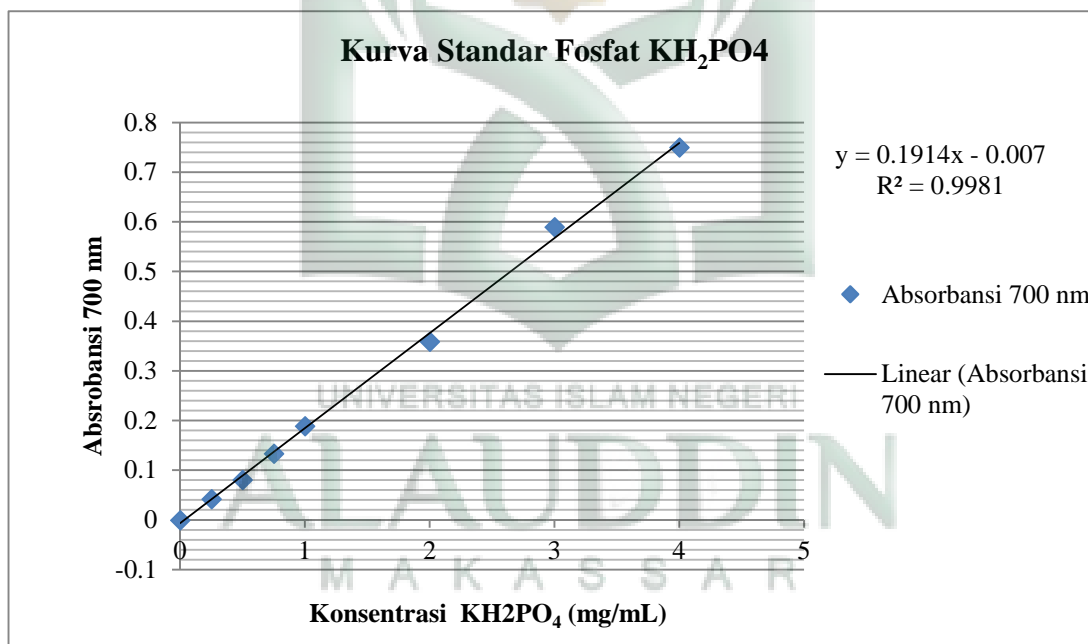
c. Data pengukuran kadar protein enzim fitase (mg/mL)

No	Variasi Media Produksi	Kadar Protein (mg/mL)		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata
1	Ca Fitat - (NH ₄) ₂ SO ₄	18	21	19.5
2	Ca Fltat - Yeast Exstract	12	12	12.0
3	Ca Fitat - Pepton	15	16	15.5
4	Padi - (NH ₄) ₂ SO ₄	18	23	20.5
5	Padi – Yeast	27	25	26.0
6	Padi – Pepton	24	22	23.0
7	Jagung - (NH ₄) ₂ SO ₄	25	26	25.5
8	Jagung – Yeast	20	21	20.5
9	Jagung - Pepton	27	26	26.5
10	Kedelai - (NH ₄) ₂ SO ₄	50	47	48.5
11	Kedelai - Yeast	45	47	46.0
12	Kedelai - Pepton	47	46	46.5

Lampiran 12.: Data Penentuan Aktivitas Fitase

a. Pengukuran Kurva Standar Fosfat KH_2PO_4

Konsentrasi Fosfat (mg/mL)	Absorbansi 700 nm
0.00	0.000
0.25	0.042
0.50	0.081
0.75	0.134
1.00	0.189
2.00	0.359
3.00	0.590
4.00	0.750



b. Absorbansi pengukuran aktivitas fitase

No	Variasi Media Produksi	Absorbansi 700 nm	
		Ulangan 1	Ulangan 2
1	Ca Fitat - (NH ₄) ₂ SO ₄	1.300	1.201
2	Ca Fitat - Yeast Extract	1.258	1.227
3	Ca Fitat - Pepton	1.221	1.264
4	Padi - (NH ₄) ₂ SO ₄	1.240	1.283
5	Padi - Yeast	1.299	1.256
6	Padi - Pepton	1.354	1.237
7	Jagung - (NH ₄) ₂ SO ₄	1.297	1.441
8	Jagung - Yeast	1.290	1.254
9	Jagung - Pepton	1.299	1.232
10	Kedelai - (NH ₄) ₂ SO ₄	1.236	1.255
11	Kedelai - Yeast	1.299	1.306
12	Kedelai - Pepton	1.420	1.697

Pengukuran aktivitas fitase dengan cara nilai absorbansi dimasukkan dalam regresi linear dari kurva standar Fosfat:

$$y = 0.191x - 0.007$$

$$y = ax - b$$

$$x = \left(\frac{y + b}{a} \right)$$

$$= \frac{1,697 + 0,007}{0,191} = \frac{1,704}{0,191}$$

$$= \mathbf{8,921 \text{ U/mL}}$$

c. Data pengukuran aktivitas Fitase

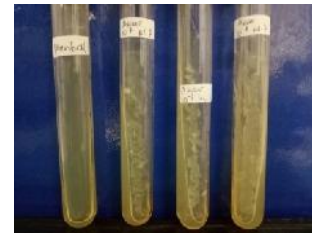
No	Variasi Media Produksi	Aktivitas Fitase (U/mL)		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Rerata
1	Ca Fitat - (NH ₄) ₂ SO ₄	6.843	6.325	6.58
2	Ca Fitat - Yeast Extract	6.623	6.461	6.54
3	Ca Fitat - Pepton	6.429	6.654	6.54
4	Padi - (NH ₄) ₂ SO ₄	6.529	6.754	6.64
5	Padi - Yeast	6.838	6.613	6.73
6	Padi - Pepton	7.126	6.503	6.81
7	Jagung - (NH ₄) ₂ SO ₄	6.827	7.581	7.20
8	Jagung - Yeast	6.791	6.602	6.70
9	Jagung - Pepton	6.838	6.487	6.66
10	Kedelai - (NH ₄) ₂ SO ₄	6.508	6.603	6.56
11	Kedelai - Yeast	6.838	6.874	6.86
12	Kedelai - Pepton	7.471	8.921	8.20

Lampiran 13: Dokumentasi Penelitian

1. Bakteri *Burkholderia lata*



Zona bening Akar 10^{-7} KL.7
penghasil fitase (PSM - Ca Fitat)



Peremajaan bakteri LB miring
inkubasi 37 °C 24 jam

2. Peramajan bakteri LB Cair (Starter bakteri) 50 jam (2 hari 2 jam)



Sebelum inkubasi



Inokulasi Bakteri



setelah inkubasi 180 rpm 37 °C (Starter Bakteri)

3. Optimalisasi media produksi fitase variasi sumber fitat dan sumber nitrogen



Pembuatan media



Pengukuran pH 7



Inokulasi starter bakteri



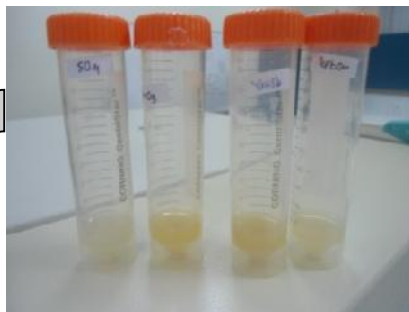
Sebelum inkubasi



Dinkubasi 180 rpm 37 °C



Setelah inkubasi



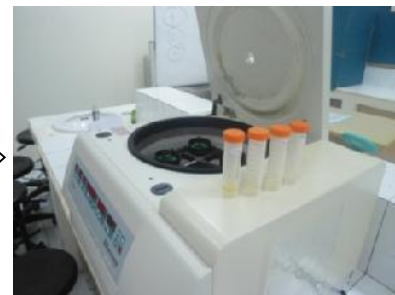
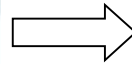
Sebelum sentrifugasi



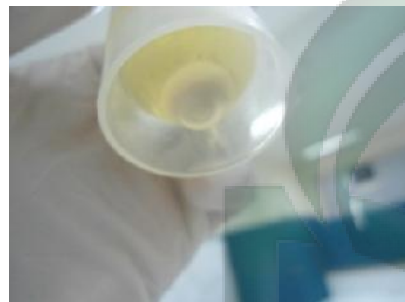
Panen



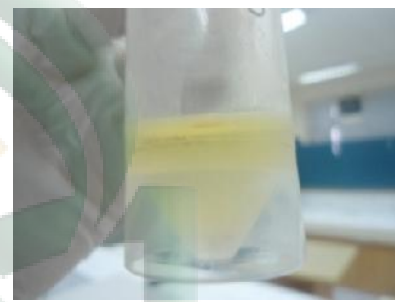
Sentrifuge 5000 rpm 35 menit 4 °C



Setelah sentrifugasi



Lapisan bawah (pellet)



Lapisan atas (Supernatan)



Enzim Kasar simpan di suhu rendah 4 °C (Kulkas)

4. Pengukuran aktivitas fitase



Masing-masing enzim diambil 0,15



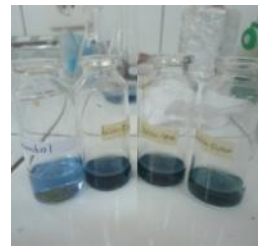
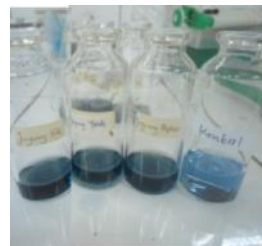
+ 0,6 mL Substrat Buffer Tris-HCl 0,1 M mengandung 2 mM Ca-Fitat dan 2 mM CaCl_2



+ 0,75 mL TCA 5% dan +1,5 mL Reagen warna Molybdat



Vortex lalu Inkubasi 37 °C 30 menit

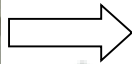


Kemudian divoteks, lalu diukur absorbansi pada spektrofotometer 700 nm Kontrol sebagai Blanko, Dibuat sesuai dengan pembuatan Blanko Kurva standar Fosfat

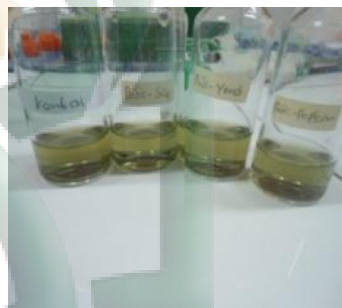
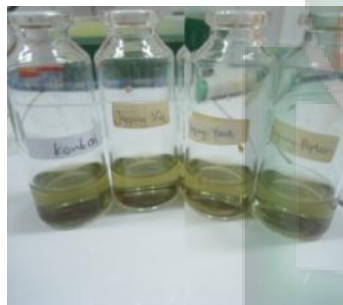
5. Pengukuran kadar protein



Masing-masing enzim diambil 0,1 mL



+ 5 mL Reagen Bradfor, lalu divorteks



Setelah penambahan reagen, ukur absorbansi spektrofotometer 595 nm
Kontrol sebagai Blanko, dibuat sesuai Blanko pembuatan kurva standa protein (Bradfor)

Lampiran 14.: Dokumetasi Alat dan Bahan

a. Alat





a. Bahan



RIWAYAT HIDUP



Muhammad Maslan dilahirkan di Malaysia (Sandakang) pada tanggal 16 Juni 1995. Anak ke 4 dari 5 bersaudara hasil buah kasih pasangan Manna dan Halijah. Pendidikan Formal dimulai dari Sekolah Dasar di SD Inpres 7/83 Patangnga, lulus pada tahun 2007. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 3 Tellu Siattinge, lulus tahun 2010, dan tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Dua Boccoe Kab. Bone, lulus pada tahun 2013, semasa studi menengah

penulis pernah menjadi asisten ketua laboratorium IPA (kimia) dan pernah mengikuti olimpiade kabupaten Bone kimia. sedangkan pengalaman organisasi sebagai anggota pengurus OSIS dan anggota PAKIBRAKA.

Penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar kejenjang S1 di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi. Selama jadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten dosen praktikum Laboratorium Biologi SainTek UIN (Biologi Dasar, Taksonomi Hewan, Mikrobiologi, Genetika dan Biologi Molekuler). Pernah Mendapatkan Beasiswa Prestasi Deperteman Agama (DEPAG). Penulis juga pernah melakukan praktik kerja lapangan (PKL) di Laboratorium Forensik Cabang Makassar Sul-Sel. Pengalaman organisasi penulis: Anggota ilmu dan penalaran HMJ Biologi SainTek, Anggota aspirasi Senat Mahasiswa (SEMA)-SainTek, Anggota Pengurus Cabang (DPC) Bone Kec. Dua Boccoe-Tellu siattinge. Dan penulis telah menyelesaikan studi S1 dengan judul skripsi “Optimalisasi Produksi dan Aktivitas Fitase terhadap Variasi Media (Sumber Fitat dan Sumber Nitrogen) oleh Bakteri *Burkholderia lata* strain HF Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays*)”. Email: maslan.m2@gmail.com

Kata motifasi yang selalu pesankan dari orang tua yaitu dalam bahasa bugis “*Aringngerangki*” yang artinya Hati - Hati (Taqwa) sehingga penulis mengartikan pesan orang tua yaitu, dimanapun kita berada harus berhati-hati dan kapan pun itu tetap ingat Allah swt.